

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS  
GRUPO DE NANOMEDICINA E NANOTOXICOLOGIA

LUIZA VOGADO RIBEIRO

**Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico eletroquímico  
para diagnóstico da tuberculose**

São Carlos  
2024



LUIZA VOGADO RIBEIRO

**Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico eletroquímico  
para diagnóstico da tuberculose**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular  
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Cancino-Bernardi

Versão Corrigida  
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos  
2024

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.

Ribeiro, Luisa

Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico eletroquímico para diagnóstico de tuberculose / Luisa Ribeiro; orientador Valtencir Zucolotto; co-orientadora Juliana Cancino-Bernardi - versão corrigida -- São Carlos, 2024.

78 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Imunossensores. 3. Espectroscopia de impedância eletroquímica. 4. Biossensores impedimétricos. 5. Voltametria cíclica. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Cancino-Bernardi, Juliana, co-orient. III. Título.



*Aos meus pais, Neuraci e Maronilde.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e vocação, pela oportunidade de recomeçar em cada novo dia, lutando por amor até o último instante. Pelo muito que me é dado, por pouco que eu mereça.

Agradeço aos meus pais, Neuraci e Maronilde, pelo apoio incondicional, pela presença mesmo à distância, por serem um grande exemplo de dedicação, generosidade, entrega e amor. Agradeço também às minhas irmãs, Alice e Ana, e aos meus sobrinhos José, Álvaro e Mateus. Por vocês, na luta em ser uma boa filha, irmã e tia, vale a pena.

Agradeço à minha grande família da Obra, pois a presença, a amizade e as orações de vocês me trazem consolo, alegria e esperança. De forma especial, agradeço às minhas irmãs e amigas Julimar, Ana Beatriz, Rayanna, Thalyne, Renata, Cíntia, Júlia e Raíssa pela paciência de me ouvir em meios as crises, o carinho em celebrar as pequenas e grandes conquistas, o amor e a sinceridade em me corrigir sempre que preciso. A vocês e a tantas outras pessoas, a minha gratidão por ser família, *cor unum et anima una*.

Agradeço especialmente ao meu Orientador Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela oportunidade de começar e concluir este trabalho de mestrado. Sou muito grata pela confiança e pelo exemplo de busca pela verdade e de esforço para impactar e transformar o mundo através da pesquisa científica.

Agradeço à minha Coorientadora Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi pela disponibilidade, paciência e generosidade em meio às mudanças, dúvidas e ao frequente recomeçar quando os experimentos pareciam não dar certo.

Agradeço a todos do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNANO), de modo especial à Érica Corina, pela acolhida e disponibilidade em me ajudar assim que cheguei, à Claudia Razzino, pelo bom humor contagiante e pelos conselhos durante os experimentos e análises, e ao Thales Machado e ao Marco Tuesta pelo auxílio nas medidas e discussão do Raman e AFM. Agradeço também à Simone Yamauti, à Bruna Moreira e ao Romeu Grilli, pela disponibilidade e ajuda em diversos momentos, essenciais à conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
– Processo nº 382371/2021-6 pela bolsa de concedida entre o período de 01/12/2021  
a 31/05/2023.

A todos os que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Este é o nosso destino na terra: lutar por amor até ao último instante. *Deo gratias!*”

**São Josemaria Escrivá de Balaguer**



## RESUMO

RIBEIRO, L. V. **Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico eletroquímico para diagnóstico da tuberculose**. 2024. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

A tuberculose (TB) é uma infecção micobacteriana comumente causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Relatada há mais de um século, a TB foi a principal causa de morte por um único agente infeccioso até a pandemia de coronavírus (COVID-19), ficando acima do HIV/AIDS. Os métodos tradicionais de diagnóstico de TB, como a baciloscopia de escarro, cultura líquida e, recentemente, testes moleculares, apresentam diversas limitações, como baixa sensibilidade e longos períodos de tempo para obtenção dos resultados, levando frequentemente a diagnósticos incorretos e tratamentos desnecessários. Os sensores eletroquímicos têm atraído a atenção devido à sua simplicidade, instrumentação de baixo custo, limites de detecção muito baixos e resposta rápida. Neste estudo apresenta-se um imunossensor impedimétrico eletroquímico para a detecção da proteína recombinante CFP10:ESAT6 (pCFP10:ESAT6) para diagnóstico de MTB. O imunossensor foi desenvolvido em eletrodos de óxido de índio e estanho (ITO) modificados por monocamada de (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTES) para imobilizar covalentemente anticorpos monoclonais anti-CFP10. A interação da proteína com a plataforma de reconhecimento de anticorpos foi diretamente monitorada e medida por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Os imunossensores foram caracterizados com microscopia de força atômica (AFM) e microespectroscopia Raman. Após a otimização dos parâmetros analíticos, alcançou-se uma resposta linear nas concentrações entre  $0,50 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de pCFP10:ESAT6, um limite de detecção de  $1,25 \text{ ng mL}^{-1}$  e um limite de quantificação de  $4,18 \text{ ng mL}^{-1}$ , em um tempo de ensaio de 4 horas no total. Os resultados indicam que o imunossensor desenvolvido é adequado, preciso e seletivo para a detecção da pCFP10:ESAT6, apresentando recursos excelentes para futuras aplicações de diagnóstico *point-of-care* da tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Imunossensores. Espectroscopia de impedância eletroquímica. Biossensores impedimétricos. Voltametria cíclica



## ABSTRACT

RIBEIRO, L. V. **Development of an electrochemical impedimetric immunosensor for the diagnosis of tuberculosis**. 2024. 78 p. Dissertation (Master in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Tuberculosis (TB) is a mycobacterial infection commonly caused by the etiologic agent *Mycobacterium tuberculosis*. Reported over a century ago, TB was the leading cause of death from a single infectious agent until the coronavirus (COVID-19) pandemic, ranking above HIV/AIDS. The traditional methods for TB diagnosis, for example sputum smear microscopy, liquid culture, and recently, molecular tests, present many limitations, such as the low sensitivity and long periods of time to obtain the results, frequently leading to incorrect diagnosis and unnecessary treatment. Electrochemical sensors have attracted attention due to their simplicity, low-cost instrumentation, very low detection limits, and rapid response. In this study we present an electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of recombinant protein CFP10:ESAT6 (pCFP10:ESAT6) for diagnosis of MTB. The immunosensor was developed onto indium tin oxide (ITO) electrodes modified by 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTES) monolayer to covalently immobilize anti-CFP10 antibodies. The protein interaction with the antibody recognition platform was directly monitored and measured by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The immunosensors were characterized with atomic force microscopy (AFM) and Raman microspectroscopy. After the analytical features optimization, a linear response from  $0.50 \text{ ng ml}^{-1}$  to  $50.0 \text{ ng ml}^{-1}$  of pCFP10:ESAT6, a limit of detection of  $1,25 \text{ ng ml}^{-1}$  and a limit of quantification of  $4,18 \text{ ng ml}^{-1}$  were achieved, in a 4-hour assay time. The results indicate that the immunosensor is suitable, accurate and selective for pCFP10:ESAT6 detection, presenting exquisite features for point-of-care diagnostic applications.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Immunosensors. Electrochemical impedance spectroscopy. Impedimetric biosensors. Cyclic voltammetry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da classificação de biossensores.....	34
Figura 2 - Gráfico de Nyquist.....	40
Figura 3 - Circuito equivalente de Randles.....	41
Figura 4 - Representação esquemática dos gráficos de Nyquist para cada etapa da construção do imunossensor.....	42
Figura 5 - Etapas de fabricação do imunossensor. ....	46
Figura 6 - Caracterização eletroquímica das principais etapas de construção do imunossensor para pCFP10:ESAT6 .....	51
Figura 7 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de bloqueio com ETA em 15, 30, 45 e 60 min. ....	54
Figura 8 - Estudos de otimização do imunossensor, variando a concentração de ETA em 50, 100 e 150 mmol L <sup>-1</sup> .....	55
Figura 9 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de imobilização do anti-CFP10/EDC/NHS em 30, 45, 60, 90 e 120 min. ....	56
Figura 10 - Estudos de otimização do imunossensor, variando a concentração de anti-CFP10 em 5, 10, 15 e 20 µg mL <sup>-1</sup> . ....	57
Figura 11 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de interação anti-CFP10/pCFP10:ESAT6 em 15, 30, 45, 60 e 90 min.....	58
Figura 12 - Espectro Raman do ITO, ITO/APTES, ITO/APTES/anti-CFP10 e ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6. ....	59
Figura 13 - Imagens 3D obtidas por AFM das superfícies de A) ITO. B) ITO/APTES. C) ITO/APTES/anti-CFP10. D) ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6.....	60
Figura 14 - Curva analítica dos eletrodos de ITO obtida obtida variando a concentração de pCFP10:ESAT6 entre 0,5 ng mL <sup>-1</sup> e 50 ng mL <sup>-1</sup> . ....	62
Figura 15 - A) Voltamograma cíclico e B) Gráfico de Nyquist da etapa de repetibilidade do imunossensor. [pCFP10:ESAT6] = 4 ng mL <sup>-1</sup> . ....	63
Figura 16 - A) Voltamograma cíclico e B) Gráfico de Nyquist do imunossensor utilizando a proteína NS1 DENV nos testes de seletividade; C) Voltamograma cíclico e D) Gráfico de Nyquist do imunossensor utilizando a proteína SARS-CoV-2 Spike nos testes de seletividade. [NS1 DENV] = 20 ng mL <sup>-1</sup> e [Spike] = 20 ng mL <sup>-1</sup> . ....	64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de rugosidade média quadrática (RMS) extraídos dos perfis correspondentes de AFM das superfícies do eletrodo. ....	61
Tabela 2 - Resultados dos experimentos de repetibilidade. ....	63
Tabela 3 - Resultados dos experimentos de reprodutibilidade. ....	63
Tabela 4 - Testes rápidos e imunossensores para <i>M. tuberculosis</i> . ....	65



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Impedância eletroquímica. ....	38
Equação 2 – Equação da curva analítica do imunossensor.....	49
Equação 3 - Limite de detecção do imunossensor.....	50
Equação 4 - Limite de quantificação do imunossensor. ....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Anticorpo

AG – Antígeno

AFM – Microscopia de Força Atômica, sigla do inglês *atomic force microscopy*

APTES – (3-Aminopropil) trietoxysilano

CE – Contraeletrodo

CFP10 - 10 kDa *culture filtrate antigen*

CFU – Unidades formadoras de colônias bacterianas

COVID-19 – *coronavirus disease 2019*

ITO – Eletrodo de óxido de índio e estanho

DNA – ácido desoxirribonucleico

DR-TB – Tuberculose droga-resistente

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

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

ESAT6 – *early secreted antigenic target 6-kDa protein*

ETA – Etanolamina

FRA – *Frequency Analyser Software*

GPES – *General Purpose Electrochemical Systems*

HIV/AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LTB – Tuberculose latente

MDR-TB – Tuberculose multirresistente

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC – complexo do *Mycobacterium tuberculosis*

NHS – N-hidroxisuccinimida

OCP – Potencial de célula aberta

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Tampão fosfato

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase

POC – *point-of-care*

RE – Eletrodo de referência

RMS – Rugosidade média quadrática

RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina

TB – Tuberculose

VC – Voltametria cíclica

WE – Eletrodo de trabalho

XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente

## LISTA DE SÍMBOLOS

$E$  – Potencial

$i$  – Corrente

$E_{pc}$  – Potencial de pico catódico

$E_{pa}$  – Potencial de pico anódico

$i_{pc}$  – Corrente de pico catódica

$i_{pa}$  – Corrente de pico anódica

$e^-$  - Elétron

$\text{Å}$  – Angstrom

$Z$  – Impedância

$\omega$  – Frequência angular

$\phi$  – Ângulo de fase entre os sinais de entrada e saída

$i$  – Número imaginário ( $\sqrt{-1}$ )

$\tilde{V}$  – Fasor do potencial

$\tilde{I}$  – Fasor da corrente

$Z'$  – Resistência dependente da frequência

$Z''$  – Capacitância dependente da frequência

$R_s$  - Resistência da solução

$C_{dl}$  – Capacitância da dupla camada elétrica

$R_{ct}$  - Transferência de resistência de carga

$W$  – Impedância de Warburg

$\Omega$  - Ohm

$V$  – Volts

$Hz$  – Hertz

$\Delta E$  – Diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico

$A$  – Ampère

$\Delta R_{ct_2}$  - Diferença da resistência de transferência de carga do ITO antes e após a conjugação da proteína

$t_{bloq}$  – Tempo da reação de bloqueio com ETA

$t_{Ab}$  – Tempo de imobilização do anti-CFP10/EDC/NHS

$t_{prot}$  – Tempo de interação anti-CFP10/pCFP10:ESAT6

$\Delta R_{ct(anti-CFP10.pCFP10:ESAT6)}$  – Valor relativo à transferência de carga após o reconhecimento da pCFP10:ESAT6

$\sigma_{blk}$  - Desvio padrão do branco

$a$  – coeficiente linear da equação da curva analítica

$b$  – coeficiente angular da equação da curva analítica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	Tuberculose .....	29
2.1.1	Métodos tradicionais de diagnóstico .....	30
2.1.2	Estratégia pelo Fim da Tuberculose e a pandemia da COVID-19 .....	32
2.2	Eletroquímica – Plataformas de diagnóstico rápido para TB .....	32
2.2.1	Sensores e biossensores eletroquímicos.....	33
2.2.1.1	Imunossensores.....	36
2.2.1.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	37
3	OBJETIVOS .....	43
3.1	Objetivo geral.....	43
3.2	Objetivos específicos .....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
4.1	Materiais .....	45
4.2	Métodos .....	45
4.2.1	Fabricação do imunossensor.....	45
4.2.2	Medidas eletroquímicas .....	47
4.2.3	Estudos de otimização dos imunossensores .....	48
4.2.4	Caracterização morfológica dos imunossensores eletroquímicos .....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1	Modificação dos eletrodos .....	51
5.2	Estudos de otimização dos imunossensores .....	53
5.2.1	Tempo de bloqueio .....	53
5.2.2	Concentração de etanolamina .....	54
5.3	Caracterização dos imunossensores via microscopia Raman e AFM .....	58

5.4	Cálculo das figuras de mérito dos imunossensores .....	61
6	CONCLUSÕES.....	69
7	PERSPECTIVAS .....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma infecção micobacteriana comumente causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), conhecido como bacilo de Koch, podendo ser desencadeada também por outras bactérias do gênero *mycobacterium* (1). Reportada pela primeira vez há mais de um século, a TB foi a principal causa de mortalidade por um único agente infeccioso, em todo o mundo, sendo ultrapassada pela COVID-19 em 2020 (2). De acordo com o último Relatório Global de Tuberculose (*Global Tuberculosis Report*) da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve cerca de 10,6 milhões de novos casos e 1,6 milhão de óbitos por TB, no ano de 2021 (3). O início da pandemia da COVID-19 impactou negativamente o acesso ao diagnóstico e tratamento da TB, devido à reorganização global das ações, serviços e sistemas de saúde exigidos para combater a pandemia, que reverteu anos de progresso no controle da tuberculose (3). Este impacto permanece perceptível mesmo após 4 anos desde o início da pandemia da COVID-19 e o desenvolvimento de tratamentos e vacinas para a doença (3). Estima-se que em 2020 houve uma diminuição em 25% no número de diagnósticos e um aumento de 26% na mortalidade por TB, em todo o mundo (2). Em 2015, a OMS publicou a Estratégia pelo Fim da Tuberculose (*End TB Strategy*) (4), na qual foram estabelecidas diretrizes para a erradicação da epidemia de tuberculose até o ano de 2035. O primeiro pilar consiste na prevenção e cuidado integrados, com foco no paciente, incluindo o desenvolvimento de métodos para o diagnóstico precoce da doença.

Os métodos tradicionais de diagnóstico da TB são a radiografia de tórax, baciloscopia de escarro, cultura líquida e testes moleculares (5). Entretanto, estes métodos apresentam diversas limitações, como a incapacidade de detectar infecção latente (LTB), a não-diferenciação entre bacilos vivos e mortos, não sendo úteis para indicar a severidade da doença, baixa sensibilidade e longos períodos de tempo para a obtenção do resultado inicial. No caso da cultura líquida, o diagnóstico pode levar mais de 2 semanas, estendendo-se possivelmente para 8 semanas (5), o que frequentemente resulta em falsos positivos e tratamentos desnecessários. O diagnóstico precoce de TB é essencial para o rápido início da conduta terapêutica, prevenindo o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e melhorando o prognóstico do tratamento. Diversos testes moleculares rápidos são recomendados

pela OMS como ferramentas iniciais para o diagnóstico da TB, como o *Xpert MTB/RIF Ultra* (Ultra) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) e o *Truenat MTB/RIF* (Molbio Diagnostics, Verna, India), incluindo alguns que podem detectar resistência aos medicamentos de forma simultânea (3). Contudo, os custos e a infraestrutura necessária aos métodos de testagem molecular impedem sua produção e aplicação em larga escala, e muitas regiões ao redor do mundo ainda dependem de testes de diagnóstico de TB obsoletos (6).

Neste contexto, os biossensores eletroquímicos surgiram como uma alternativa promissora, devido à sua simplicidade, instrumentação de baixo custo, limites de detecção muito baixos e resposta rápida (7). De acordo com a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o biossensor é um dispositivo analítico autônomo e integrado, no qual um elemento biológico (fragmentos de DNA, anticorpos e aptâmeros, por exemplo) é retido em contato direto com um elemento transdutor (8). Os biossensores eletroquímicos, nos quais o elemento transdutor normalmente é um eletrodo ou um transistor de efeito de campo, são particularmente interessantes para integração com dispositivos portáteis, devido à sua fácil miniaturização, fabricação em lote e integração com um módulo de aquisição eletrônica em um único chip (9). Adicionalmente, sinais eletroquímicos como corrente elétrica e potencial podem ser coletados por instrumentos simples, portáteis, de baixo custo e com baixo consumo de energia, sendo muito promissores para o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico *point-of-care* (POC) (9).

Neste trabalho de mestrado descreve-se o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico eletroquímico para detecção e quantificação simples e efetiva da proteína CFP10:ESAT6 (pCFP10:ESAT6). A faixa de interesse deste biomarcador em pacientes de TB é de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  (10). Eletrodos de óxido de índio e estanho (ITO) descartáveis foram utilizados como transdutores eletroquímicos. Os eletrodos de ITO são substratos adequados para aplicações com biomoléculas, por terem baixa resistividade de superfície, estabilidade química e permitirem modificações químicas, bem como a ampla janela de trabalho eletroquímica e propriedades eletroquímicas estáveis. Uma camada de (3-aminopropil) trietoxysilano (APTES) foi utilizada para modificar a superfície do ITO, de modo a obter uma superfície com alta densidade de grupos amino, os quais foram empregados para imobilizar covalentemente os anticorpos monoclonais anti-CFP10, através de um

processo de *crosslinking* com EDC/NHS. Em seguida, a interação da proteína CFP10:ESAT6 foi monitorada e medida pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O imunossensor otimizado foi aplicado de forma bem-sucedida para detectar a pCFP10:ESAT6 em concentrações desde 0,500 a 200 ng mL<sup>-1</sup>. Os resultados indicam que o imunossensor desenvolvido foi adequado e pode ser utilizado como um dispositivo rápido, sensível e confiável para a detecção da pCFP10:ESAT6 no diagnóstico da tuberculose.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa comumente causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A doença atinge tipicamente os pulmões (TB pulmonar), porém pode afetar outros locais do corpo, como rins, cérebro e pele (TB extrapulmonar) (2). Presente ao longo de toda a história conhecida da humanidade e pré-história, a TB é uma doença antiga, com indícios de que as cepas modernas de *M. tuberculosis* tenham se originado de um ancestral comum há cerca de 15.000 a 20.000 anos (11), porém, de acordo com análises baseadas na taxa de mutação da *M. tuberculosis*, grande parte das atuais cepas surgiu entre 250 e 1000 anos atrás (12). A TB surgiu em grandes epidemias, regredindo em seguida, comportando-se assim como uma doença infecciosa, porém com uma escala de tempo que vai de encontro a ciclos epidêmicos (1). A causa da TB permaneceu desconhecida até 24 de março de 1882, quando Robert Koch, médico, patologista e bacteriologista alemão, descobriu o bacilo responsável, nomeando-o *M. tuberculosis* (e deste fato, também é conhecido como bacilo de Koch). Em 1890, Koch elucidou a etiologia da tuberculose com a apresentação dos postulados de Koch-Henle, que até hoje definem o padrão para a demonstração de etiologia infecciosa, e lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina de 1905 (1).

Atualmente, a TB permanece sendo uma das doenças que mais causa problemas de saúde e uma das principais causas de óbito em todo o mundo. Até a pandemia da COVID-19 em 2020, a TB foi a principal causa de morte por um único agente infeccioso, classificando-se acima do HIV/AIDS (2). O contágio de TB ocorre quando pessoas com a doença expõem a bactéria no ar (e. g. tosse e espirro). Os indivíduos infectados são classificados como portadores de infecção por tuberculose latente (LTB), um quadro clínico assintomático e não transmissível, e tuberculose ativa, caracterizada pela presença de sintomas clínicos decorrentes de infecção que pode ocorrer em múltiplos órgãos e que pode ser transmitida (13). Estima-se que cerca de 25% da população global tenha sido infectada com TB (14), porém a maioria das pessoas não chega a desenvolver a doença, isto é, estão infectadas pela LTB (15,16). Além disso, a maioria das pessoas com imunorreatividade à TB não

desenvolve a forma ativa após imunossupressão, sugerindo que eles eliminaram a infecção enquanto mantém a memória imunológica para a MTB (15). Cerca de 90% das pessoas que desenvolvem TB são adultos, com mais casos entre homens do que em mulheres (3). Os sintomas mais comuns de TB são tosse prolongada (às vezes com sangue), dor no peito, fraqueza e fadiga, perda de peso e febre. Estes sintomas ocorrem somente quando uma pessoa desenvolve a doença, não apenas quando é infectada (2).

### 2.1.1 Métodos tradicionais de diagnóstico

Caso não seja tratada, a taxa de mortalidade por TB é alta, chegando a aproximadamente 50% dos pacientes contaminados. No entanto, com o devido tratamento, cerca de 85% das pessoas podem ser curadas (3). De acordo com as diretrizes estabelecidas pela OMS (17), o tratamento da TB é feito com a utilização de antibióticos, tanto para a tuberculose ativa quanto para a LTB. Dentre estes, os antibióticos mais comuns são isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina (denominados medicamentos de primeira linha), os quais devem ser tomados diariamente por 4 a 6 meses para serem eficientes. Além disso, existe uma forma de tuberculose que não responde aos medicamentos tradicionais, denominada tuberculose droga-resistente (*drug-resistant* TB, ou DR-TB), a qual, segundo dados do último Relatório Global, contou com 450.000 novos casos entre 2020 e 2021 (3).

A OMS utiliza quatro categorias para classificar os casos de DR-TB: TB resistente à isoniazida, TB resistente à rifampicina (RR-TB), TB multirresistente, isto é, à isoniazida e rifampicina (MDR-TB), e TB resistente à rifampicina, a um medicamento do tipo fluoroquinolona e a pelo menos um medicamento entre bedaquilina e linezolida (TB extensivamente resistente – XDR-TB) (3). A DR-TB pode ocorrer quando os medicamentos para tratamento são mal utilizados ou mal administrados (i. e., o paciente não segue o tratamento com regularidade, não toma todos os medicamentos, ou estes são de baixa qualidade), quando o portador da TB provém de áreas onde a DR-TB é comum ou quando este convive com pessoas com DR-TB. O tratamento para DR-TB requer regimes que incluam medicamentos de segunda linha, como bedaquilina e fluoroquinolonas; esses regimes são mais caros

(acima de US\$ 1.000 por pessoa) e causam mais efeitos colaterais do que os tratamentos de primeira linha para TB (3).

Os métodos de diagnóstico de TB foram aprimorados significativamente ao longo dos anos, incluindo tomografia por raios-X de tórax, teste de tuberculina, baciloscopia de escarro, broncoscopia, tomografia computadorizada, cultura líquida e análise de biópsia de tecido (6). Dentre estes, os testes utilizados como padrão ouro, baciloscopia de escarro e cultura líquida, apresentam diversas limitações, como a incapacidade de detectar infecção latente (LTB), a não-diferenciação entre bacilos vivos e mortos (não sendo úteis para indicar a severidade da doença), baixa sensibilidade e longos períodos de tempo para a obtenção do resultado inicial (no caso da cultura líquida, pode levar mais de 2 semanas, estendendo-se possivelmente para 8 semanas) (5).

Para contornar este cenário, a OMS recomenda o uso de testes moleculares rápidos para diagnóstico inicial da TB, incluindo os testes Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) e o Truenat MTB, MTB Plus e MTB-RIF Dx (Molbio Diagnostics, Verna, India), que podem detectar a resistência aos medicamentos de forma simultânea (17). Ambos utilizam PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) em tempo real para detectar o DNA do complexo do *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), sendo que o Xpert Ultra consiste em um sistema baseado em cartucho, que utiliza a tecnologia beacon para detectar mutações no gene *rpoB* (RNA polimerase beta), especificamente na sequência central de 81 pb (incluindo os códons 508 a 534), em um ensaio heminested-PCR (18,19). Mutações nesta região central do gene *rpoB* estão associadas à resistência à rifampicina (18). Já o teste Truenat MTB e MTB Plus é um teste de amplificação de ácido nucleico baseado em chip, no qual o DNA extraído é adicionado para execução do PCR em um dispositivo termociclador portátil, operado por bateria (Truelab Uno™) (20). O alvo do teste Truenat MTB é o gene da ribonucleosídeo-difosfato redutase *nrdZ*, e o do Truenat MTB-RIF Dx, os códons na posição 509 a 533 do *rpoB*, ou seja, muito semelhante à do teste Xpert Ultra (20–22). No entanto, estes métodos de teste molecular demandam tal infraestrutura e custos que impedem a sua produção e aplicação em larga escala, principalmente em países subdesenvolvidos onde a percentagem de pacientes com a doença é grande, dependendo exclusivamente de métodos de diagnóstico obsoletos (6).

### 2.1.2 Estratégia pelo Fim da Tuberculose e a pandemia da COVID-19

De acordo com o último relatório global de Tuberculose da OMS, houve cerca de 10,6 milhões de novos casos e 1,6 milhão óbitos por TB, em todo o mundo, no ano de 2021 (3). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, 68,3 mil pessoas adoeceram por TB em 2021 e 4,5 mil pessoas morreram de TB em 2020 (23). O início da pandemia da COVID-19 impactou negativamente o acesso ao diagnóstico e tratamento da TB, devido à reorganização global das ações, serviços e sistemas de saúde, que reverteu anos de progresso no controle da tuberculose (3). Este impacto permanece perceptível mesmo após 3 anos desde o início da pandemia da COVID-19 e o desenvolvimento de tratamentos e vacinas para a doença (3)(3). Estima-se que em 2020 houve uma diminuição em 25% no número de diagnósticos e um aumento de 26% na mortalidade por TB, em todo o mundo (2).

Em 2015, a OMS publicou a *Estratégia pelo Fim da Tuberculose (End TB Strategy)* (4), na qual foram estabelecidas diretrizes para, até o ano de 2035, reduzir em 90% o número de óbitos por TB e em 90% o coeficiente de incidência da TB (*i. e.*, número de casos da doença por 100 mil habitantes). Deriva-se então a importância de fortalecer as estratégias de manutenção do diagnóstico, tratamento e prevenção da TB. O primeiro pilar consiste na prevenção e cuidado integrados, centrados na pessoa com TB, incluindo o desenvolvimento de métodos para o diagnóstico precoce da doença. Além disso, o terceiro pilar trata da intensificação da pesquisa e inovação, de modo especial na promoção da incorporação de tecnologias e iniciativas inovadoras para aprimorar o controle da TB.

## 2.2 Eletroquímica – Plataformas de diagnóstico rápido para TB

Diversas plataformas de diagnóstico rápido têm sido desenvolvidas, destacando-se entre elas os biossensores eletroquímicos devido à sua simplicidade, instrumentação de baixo custo, limites de detecção muito baixos e resposta rápida. Nesta seção, serão apresentados os sensores e biossensores eletroquímicos, de forma especial os imunossensores e a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), utilizada neste estudo.

### 2.2.1 Sensores e biossensores eletroquímicos

Como definido pela IUPAC, biossensores são dispositivos analíticos nos quais um elemento biológico de reconhecimento (como enzimas, anticorpos, antígenos, aptâmeros e DNA) é retido em contato direto com um elemento de transdução (transdutores eletroquímicos, ópticos e mecânicos, por exemplo) (8). Este tipo de dispositivo foi introduzido pela primeira vez em 1962, com o desenvolvimento do eletrodo de enzima para glicose por Leland Clark Jr (24). Inicialmente, os biossensores foram desenvolvidos para aplicações *point-of-care*, *i.e.*, no local de atendimento, para análises clínicas de desde laboratórios especializados a ambientes públicos (8).

A Figura 1 representa ilustra a classificação dos biossensores, de acordo com a camada de bioreconhecimento e o elemento de transdução. De modo geral, os biossensores produzem um sinal eletrônico ou óptico proporcional à interação específica entre a molécula alvo e a molécula de bioreconhecimento imobilizada no biossensor, que pode ser mensurado e gravado de forma apropriada (25). Dentre as diversas plataformas de bioreconhecimento, os biossensores eletroquímicos, nos quais o elemento transdutor é geralmente um eletrodo ou um transistor de efeito de campo, são os mais adequados para análises *on-site* e particularmente interessantes para integração com dispositivos portáteis, devido à sua fácil miniaturização, fabricação em lote e integração com um módulo de aquisição eletrônica em um único chip. Adicionalmente, sinais eletroquímicos como corrente elétrica e potencial podem ser coletados por instrumentos simples, portáteis, de baixo custo e com baixo consumo de energia, sendo muito promissores para o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico *point-of-care* (9).

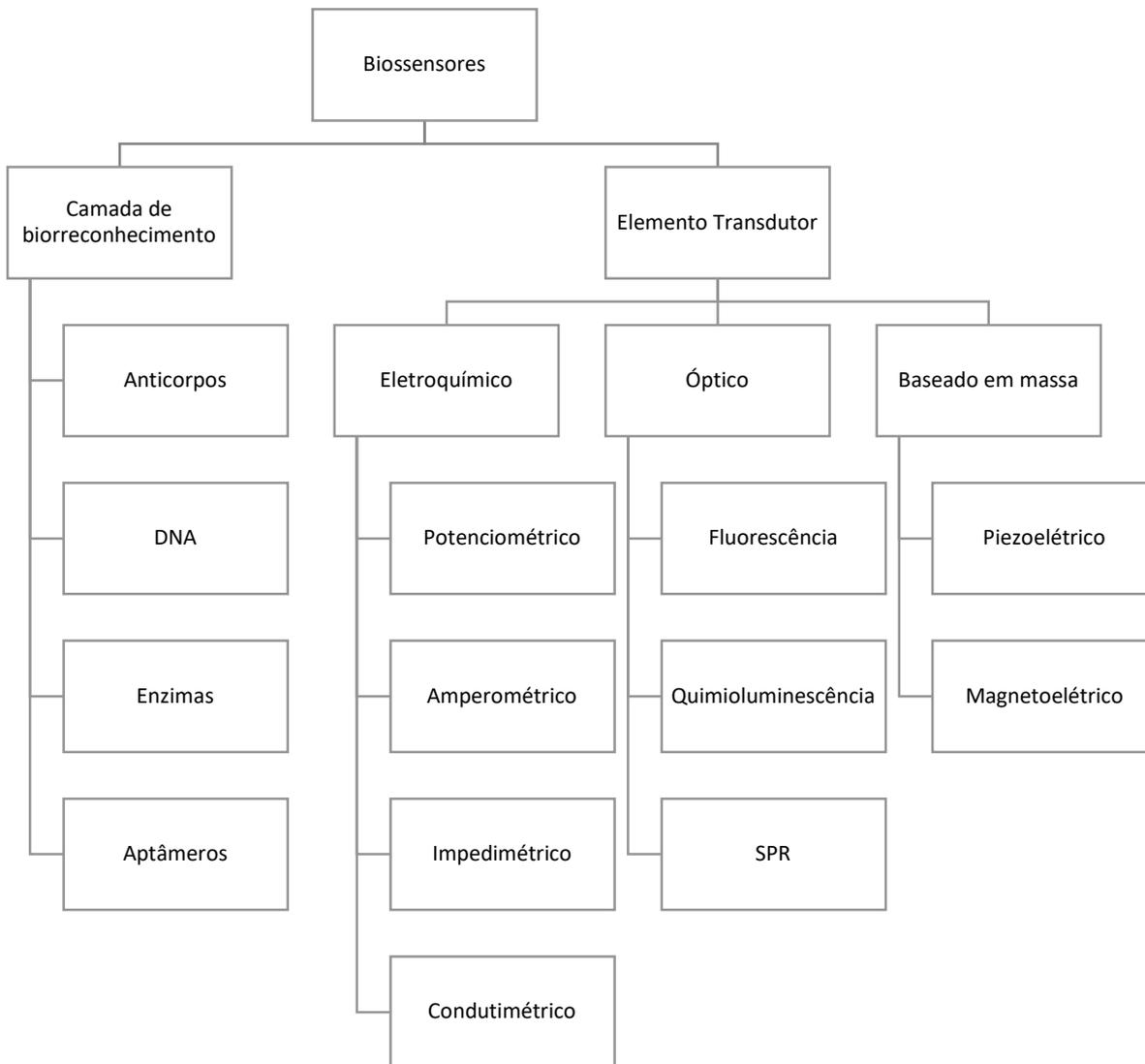


Figura 1 - Representação esquemática da classificação de biossensores.

Fonte: Adaptada de MUNGROO; NEETHIRAJAN (26)

Em 2016, a OMS introduziu os critérios chamados ASSURED para que os testes POC possam ser utilizados: estes devem ser acessíveis (A - *affordable*), sensíveis (S - *sensitive*), específicos (S - *specific*), de fácil utilização (U - *user-friendly*), rápidos e robustos (R - *rapid and robust*), sem necessidade de equipamentos (E - *equipment free*) e entregáveis (D - *deliverable*) ao usuário final, permitindo a testagem *on-site* e o diagnóstico rotineiramente para pacientes individuais e consumidores. Em 2018, outros dois critérios foram adicionados, conectividade em tempo real (R - *real time connectivity*) e facilidade de coleta de amostras (E - *ease of specimen collection*), tornando o acrônimo REASSURED (26). Portanto, o desenvolvimento de dispositivos

de diagnóstico POC desempenham um papel decisivo no diagnóstico e tratamento das principais doenças globais.

As proteínas secretadas pelo MTB no organismo infectado ganharam atenção nos últimos anos tanto para o desenvolvimento de vacinas, quanto para o desenvolvimento de biossensores. Algumas delas, com destaque CFP-10 (10 kDa *culture filtrate antigen*) quanto ESAT-6 (*early secreted antigenic target 6kDa protein*) são codificados pela região RD-1 do genoma da MTB e estão ausentes em todas as cepas do bacilo Calmette-Guerin (BCG)(27). Nos últimos anos, diversos biossensores foram desenvolvidos para o diagnóstico da TB, por meio da detecção dos antígenos ESAT6, CFP10 e o complexo proteico CFP10:ESAT6 (pCFP10:ESAT6). Diouani e colaboradores desenvolveram um imunossensor eletroquímico para a detecção da ESAT6 (28). Neste estudo, a interação entre o antígeno ESAT6 e o bioreceptor anti-ESAT6 foi avaliada pelo método de voltametria de onda quadrada. Omar e colaboradores desenvolveram um biossensor reutilizável baseado em voltametria cíclica utilizando eletrodos de níquel/óxido de grafeno/polianilina (Ni-rGO-PANI) para a detecção do antígeno ESAT6 (29). Um biossensor óptico baseado em cristal líquido foi descrito por Kim e colaboradores, para a detecção de ESAT6, o qual foi imobilizado em superfícies nanoestruturadas para detectar seus anticorpos. (30). Neste estudo, o sistema desenvolvido permite a visualização de interações bioquímicas em escala nanométrica em imagens ópticas macrométricas.

Yunus *et. al* desenvolveram um aptasensor amperométrico do tipo sanduíche para detecção do antígeno CFP10 (31). Neste estudo, um aptâmero aminado anti-CFP10 foi covalentemente imobilizado no eletrodo de carbono serigrafado descartável e a quantificação do antígeno foi baseada em respostas amperométricas da reação electrocatalítica entre HRP (horseradish peroxidase) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando hidroquinona como mediador de transferência eletroquímica. Kim e colaboradores desenvolveram um imunoensaio magnetoforético baseado em chip plástico para detectar CFP10, utilizando nanopartículas magnéticas de ouro, utilizando um espectrofotômetro automatizado (32).

Um imunossensor do tipo sanduíche foi desenvolvido por Azmi e colaboradores, para detectar pCFP10:ESAT6 utilizando um conjugado Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/AuMNPs/anti-CFP10-ESAT6 e um eletrodo serigrafado em ouro modificado com grafeno/polianilina (GP/PANI) (33). Neste trabalho, utilizou-se a técnica de

voltametria de pulso diferencial. Em outro estudo do mesmo grupo, um biossensor baseado em ensaio eletroquímico portátil de aptâmero-anticorpo, foi desenvolvido para detecção de MTB em amostras clínicas de escarro (34). Nesta estratégia, o aptasensor sanduíche detectou a pCFP10:ESAT6 utilizando NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  como marcador e nanocompósito de grafeno/polianilina (GP/PANI) camada de amplificação de sinal.

O limite de detecção destes biossensores varia significativamente de acordo com o método de detecção e o material utilizado. Os biossensores eletroquímicos para a detecção de ESAT6 apresentaram LOD de  $7,1 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  utilizando respectivamente os métodos de voltametria quadrada (28) e voltametria cíclica com eletrodos Ni-rGO-PANI (29). Já o sensor óptico para o mesmo antígeno ESAT6 apresentou LOD mais alto, de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (30). Para a detecção do antígeno CFP10, os limites de detecção relatados foram de  $1,22 \text{ ng mL}^{-1}$  para o aptasensor amperométrico (31) e  $1,8 \text{ pg mL}^{-1}$  para o biossensor magneto forético baseado em chip plástico (32). Entre os imunossensores que detectam a pCFP10:ESAT6, semelhantes ao desenvolvido neste trabalho, ambos apresentam LOD de  $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ .

#### 2.2.1.1 Imunossensores

Dentre todos os biossensores desenvolvidos para TB, os baseados em antígenos e anticorpos como camada de biorreconhecimento fornecem os melhores resultados. Os imunossensores são dispositivos analíticos de estado sólido que detectam a ligação de um anticorpo (AB) a seu antígeno (AG) específico, no qual a reação imunoquímica está acoplada à superfície do transdutor (35). Os imunossensores estão entre os mais importantes tipos de biossensores de afinidade, tornando-se objeto de crescente interesse por seu potencial de aplicação em áreas desde o diagnóstico clínico ao controle ambiental. Estes dispositivos, aliados à tecnologia de transdutores modernos permite a detecção e quantificação de complexos imunológicos de modo *label-free*(36).

Quando a presença de espécies estranhas (AG) é detectada no interior de um organismo vivo, anticorpos com alta especificidade são sintetizados, como parte do sistema de defesa imune. Esta habilidade de resposta rápida dos organismos quando

do reconhecimento de AG tem sido explorada de modo a criar novos dispositivos analíticos específicos com características interessantes, como sensibilidade e especificidade, além de rapidez e confiabilidade (37,38). Nos últimos anos, um grande número de biomarcadores, isto é, biomoléculas cuja presença ou nível de expressão é um indicador de uma condição patológica, têm sido frequentemente utilizados em imunossensores. Estes dispositivos representam uma forma conveniente de medir a concentração de biomoléculas em fluidos biológicos (sérum, urina, sangue e escarro, por exemplo), através de reações imunológicas (37).

Os imunossensores impedimétricos podem atuar como imunossensores diretos, onde a reação imunoquímica é diretamente determinada através da medição de mudanças físicas, induzidas pela formação do complexo anticorpo-antígeno, ou indiretos, nos quais o AB ou AG de interesse são marcados com um rótulo sensivelmente detectado (39). A imobilização apropriada do elemento de bio-reconhecimento na superfície do transdutor é de primordial importância, visto que influencia diretamente a eficiência de detecção da espécie de interesse.

De modo geral, um sistema ideal deve apresentar as seguintes especificações: habilidade de detectar e quantificar o antígeno, dentro da faixa de concentração requerida e em um intervalo de tempo razoável; capacidade de transduzir a ocorrência da ligação sem adição de reagentes externos; capacidade de repetir a medida em um mesmo dispositivo, isto é, a reação imunoquímica deve ser reversível; e a habilidade de detectar a ligação específica do antígeno em amostras reais (35). Uma técnica capaz de traduzir esse bio-reconhecimento atendendo às especificações mencionadas é a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), descrita de modo mais detalhado na seção abaixo.

#### 2.2.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica, ou EIE do inglês *electrochemical impedance spectroscopy (EIS)* é uma técnica eletroquímica que permite a análise de mecanismos tempo-dependentes, baseados na resposta do sistema eletroquímico (corrente ou potencial), coletada em frequências definidas. Esta técnica permite um maior entendimento dos mecanismos eletroquímicos na interface eletrodo/solução em uma única medida, incluindo os que ocorrem na operação de

baterias comerciais, na corrosão de metais e ligas, e em biossensores eletroquímicos (40). Diferentemente da voltametria cíclica (VC), onde toda a faixa de potencial é escaneada em determinada taxa de varredura, EIE tem a vantagem de possibilitar a realização de medidas em diferentes potenciais. As duas técnicas são, portanto, complementares, e podem ser utilizadas em conjunto para caracterizar diferentes processos em um mesmo experimento. Neste trabalho, o reconhecimento biológico não tem geração de produto de reação eletroativo, portanto a EIE é a técnica mais adequada pois permite medir variações finas na superfície do eletrodo, o que facilita a tradução do reconhecimento biológico em sinal físico.

A EIE é uma medida do tipo função de transferência, frequentemente utilizada em análise de sistemas lineares invariantes no tempo (41). A EIE utiliza uma perturbação de baixa amplitude de potencial ou corrente (5 a 20 mV, por exemplo) para excitar o sistema em diferentes frequências. Como resultado, uma corrente em fase é obtida. Mede-se então a resposta do sistema a esta perturbação, a impedância eletroquímica do sistema, dada pela razão entre o potencial aplicado e a corrente medida. A impedância  $Z$  pode ser expressa por (41):

$$Z(\omega) = \frac{\tilde{V}(\omega)}{\tilde{I}(\omega)} = \left| \frac{\tilde{V}(\omega)}{\tilde{I}(\omega)} \right| (\cos \phi(\omega) + j \sin \phi(\omega))$$

$$Z(\omega) = Z_r + iZ_j = Z' + Z''$$

Equação 1 - Impedância eletroquímica.

Onde  $\omega$  é a frequência angular,  $\phi$  o ângulo de fase entre os sinais de entrada e saída e  $i = \sqrt{-1}$  é o número imaginário.  $\tilde{V}$  e  $\tilde{I}$  são fasores, isto é, números complexos invariantes no tempo, que contam para a amplitude e a fase da função senoidal. Deste modo, a impedância eletroquímica, como definida na Equação 1, é um número complexo que depende da frequência, cuja parte real  $Z'$  é a resistência dependente da frequência e a parte imaginária  $Z''$  é a capacitância dependente da frequência. A origem do elemento  $Z'$  está na superfície do eletrodo como resultado da oposição ao fluxo de corrente, e o elemento capacitivo  $Z''$  mede o armazenamento de carga do sistema após uma aplicação de tensão. Há duas maneiras pelas quais a eletricidade pode fluir através do eletrodo na interface eletrodo-solução: quando os elétrons são transferidos para os eletrodos por meio de reações redox, denominado processo

faradaico, que se comporta de acordo com a lei de Faraday; e quando a eletricidade flui devido ao comportamento do capacitor, ainda que nenhuma carga seja transferida para a superfície do eletrodo, no chamado processo não-faradaico (42,43).

Quando o ângulo de fase entre corrente e potencial é zero, a impedância e a resistência são iguais, como em uma superfície metálica. No entanto, este ângulo de fase é diferente de zero na maioria dos sistemas elétricos reais, devido aos efeitos capacitivos e/ou indutivos. (44). Tipicamente, nos biossensores impedimétricos ocorre uma interação bioreceptor-analito, a qual modifica o campo elétrico, devido a uma alteração na capacitância e na resistência à transferência de elétrons na superfície do eletrodo (45).

Os dados de EIE são tipicamente apresentados em gráficos de Nyquist (Figura 2). Este gráfico mostra a relação entre os elementos real  $Z'$  e imaginário  $-Z''$  da impedância, em uma faixa de frequências e é geralmente utilizado para avaliar a parte resistiva do biossensor. O comportamento do sistema é diferente em frequências altas e baixas. Em altas frequências, o sinal é controlado por processos cinéticos, onde as moléculas do mediador eletroquímico mudam de direção antes que a reação ocorra na superfície do eletrodo. Este processo retarda a transferência de carga ao longo do eletrodo, denominada resistência da solução ( $R_s$ ), e parece ser um fator limitante. Em frequências médias, a resistência atinge o valor mínimo e como resultado as mudanças que ocorrem no sistema se devem à capacitância, principalmente da dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ) formada na superfície do eletrodo. Em baixas frequências, produz-se a transferência de cargas, a resistência encontrada pelos mediadores eletroquímicos se dá devido aos componentes da superfície do eletrodo e é calculada através da resistência de transferência de carga  $R_{ct}$ (46).

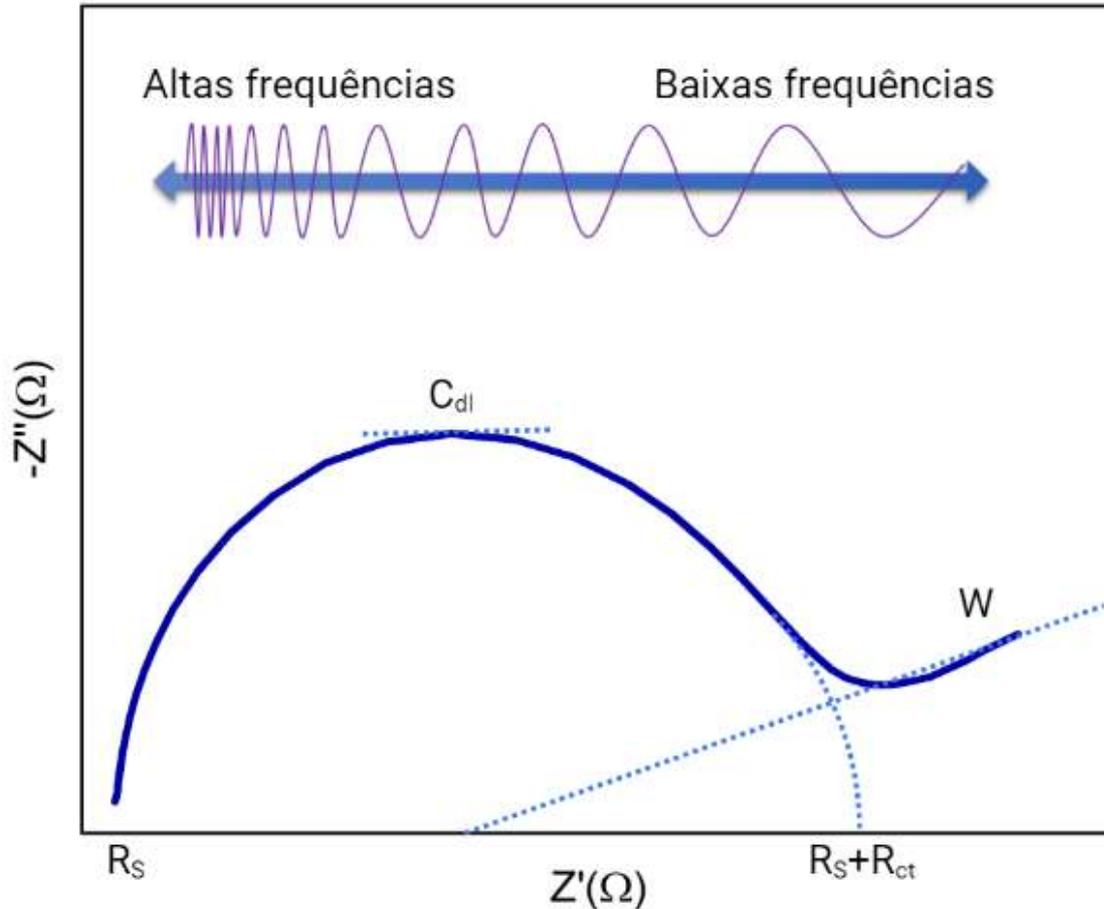


Figura 2 - Gráfico de Nyquist. Este gráfico é obtido após plotar o componente imaginário (capacitivo) em função do componente real (resistivo) da impedância. Os parâmetros relevantes são a transferência de resistência de carga ( $R_{ct}$ ), a resistência da solução ( $R_s$ ), a capacitância máxima da dupla camada ( $C_{dl}$ ) e a impedância de Warburg ( $W$ ).

Fonte: Elaborada pela autora

Os componentes e modelos do comportamento de um biossensor faradaico típico é representado pelo circuito equivalente de Randles, mostrado na Figura 3. A impedância de Warburg ( $W$ ) consiste na impedância dada pela cauda linear no final do arco do gráfico de Nyquist em baixas frequências, a qual está relacionada às limitações difusivas do sistema quando não há mais espécies portadoras de carga. O objetivo principal das medidas é calcular o valor de  $R_{ct}$  e o fluxo de corrente através da superfície do eletrodo (42).

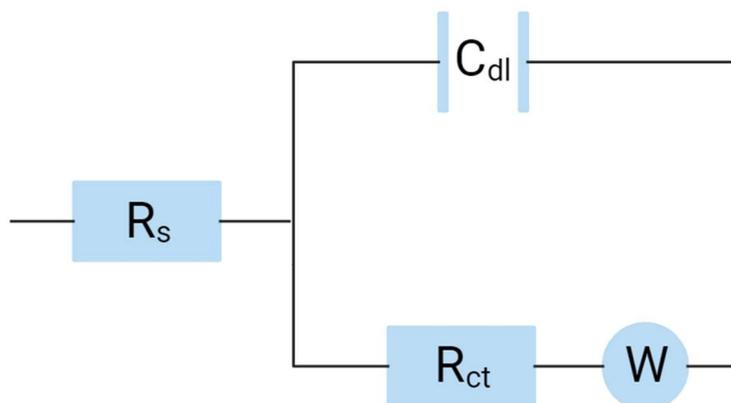


Figura 3 - Circuito equivalente de Randles. Este circuito representa um circuito elétrico utilizado como modelo de um sensor faradaico, onde  $R_s$  é a resistência da solução,  $C_{dl}$  a capacitância máxima da dupla camada,  $R_{ct}$  a transferência de resistência de carga e a  $W$  impedância de Warburg.

Fonte: Elaborada pela autora

O valor de impedância tende a aumentar com a complexidade da funcionalização do eletrodo, principalmente se essa modificação diminuir a transferência eletrônica (deixando a superfície com caráter mais isolante), pois nesse caso os elétrons possuem maior resistência de transferência de carga até atingir a superfície do eletrodo. A Figura 4 ilustra a evolução impedimétrica obtida à medida que diferentes camadas de material são depositadas na superfície do eletrodo.

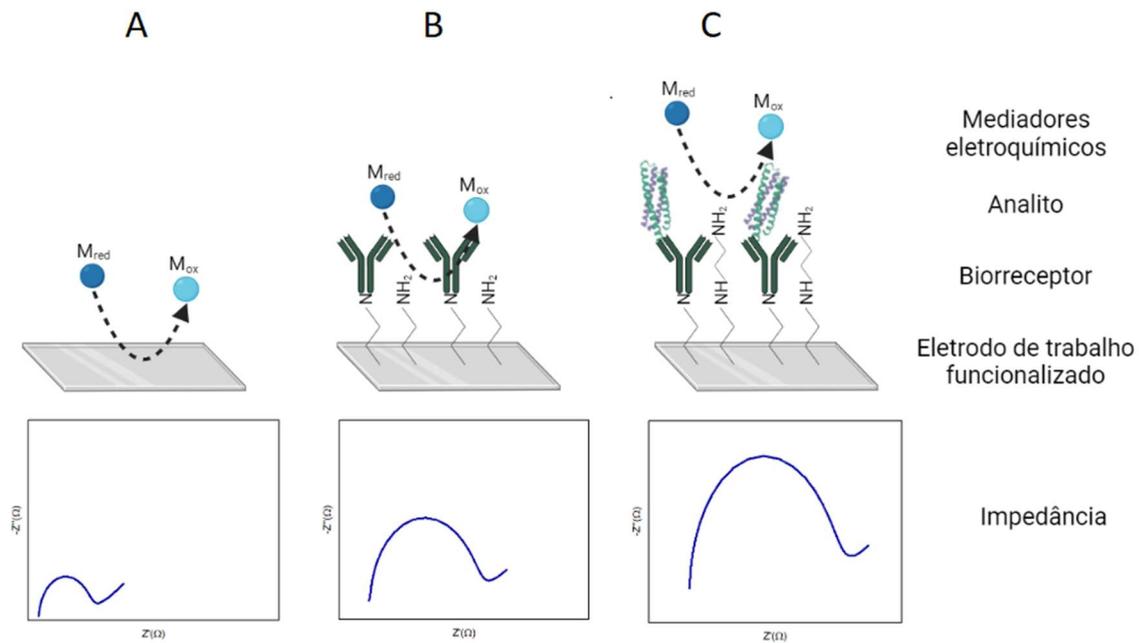


Figura 4 - Representação esquemática dos gráficos de Nyquist para cada etapa da construção do imunossensor. Com a deposição de material na superfície do eletrodo, há normalmente um aumento na resistência e capacitância, o que impede a transferência de elétrons entre os mediadores eletroquímicos presentes na solução e a superfície do eletrodo. A) ITO funcionalizado. B) Anticorpo imobilizado e C) Biorreconhecimento da proteína.

Fonte: Elaborada pela autora

A EIE é amplamente aplicada em diversas células, dispositivos e sistemas eletroquímicos, incluindo os de armazenamento e conversão de energia, corrosão, sensores e sistemas biomédicos. Esta técnica pode ser utilizada para proporcionar sistemas de diagnóstico simples, para caracterizar diferentes materiais, estruturas e processos, e para extrair informações físico-químicas detalhadas sobre um processo de interesse (40).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico eletroquímico para detecção da pCFP10:ESAT6 via biorreconhecimento dos anticorpos anti-CFP10, para diagnóstico da tuberculose.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Construir o imunossensor eletroquímico e avaliar os resultados iniciais de VC e EIE;
- Realizar experimentos de otimização em cada etapa da construção dos imunossensores, de modo a definir as condições ótimas para bioreconhecimento da pCFP10:ESAT6;
- Obter as figuras de mérito dos imunossensores, isto é, curva analítica, reprodutibilidade e repetibilidade, seletividade, e limites de detecção e quantificação;
- Caracterizar a morfologia dos imunossensores utilizando as técnicas de espectroscopia Raman e AFM em cada etapa de construção, ou seja, ITO, ITO-APTES, ITO/APTES/anti-CFP10 e ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

(3-aminopropil) trietoxysilano (APTES), hexacianoferrato de potássio (II) ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), etanolamina (ETA), N-hidroxisuccinimida (NHS) e cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., Ltd. Os anticorpos anti-CFP10 (monoclonal), as proteínas recombinantes CFP10:ESAT6 (pCFP10:ESAT6) e Dengue Virus NS1 Type 2 (NS1 DENV) foram adquiridas da MyBioSource, Inc. A proteína recombinante SARS-Cov-2 Spike foi adquirida da Sigma-Aldrich Co., Ltd. Lâminas de vidro revestidas com óxido de estanho e índio (ITO), foram adquiridas da Delta Technologies, Loveland, CO, EUA (resistividade de superfície = 8-12  $\Omega$ , área de trabalho = 0,5 cm<sup>2</sup>).

As soluções-estoque foram preparadas em solução de tampão fosfato (PB), utilizando fosfato monossódico e dissódico (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) (Sigma-Aldrich Co., Ltd). Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Água ultrapura (18,2 M $\Omega$  cm) produzida pelo sistema Millipore Milli-Q foi utilizada para preparar todas as soluções aquosas aqui empregadas.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Fabricação do imunossensor

A fabricação do imunossensor foi realizada em quatro etapas: silanização da superfície do ITO com um aminosilano, imobilização dos anticorpos, bloqueio com etanolamina e detecção da proteína, conforme ilustrado na Figura 5.

Previamente à modificação da superfície do eletrodo, as lâminas de ITO foram lavadas em banho ultrassônico utilizando uma sequência de solventes com diferentes polaridades: acetona, isopropanol, etanol e água ultrapura, durante 10 minutos em cada etapa. Este procedimento de limpeza é indispensável para evitar contaminação orgânica, a qual poderia adsorver na superfície do ITO e comprometer a eficiência de imobilização da proteína.

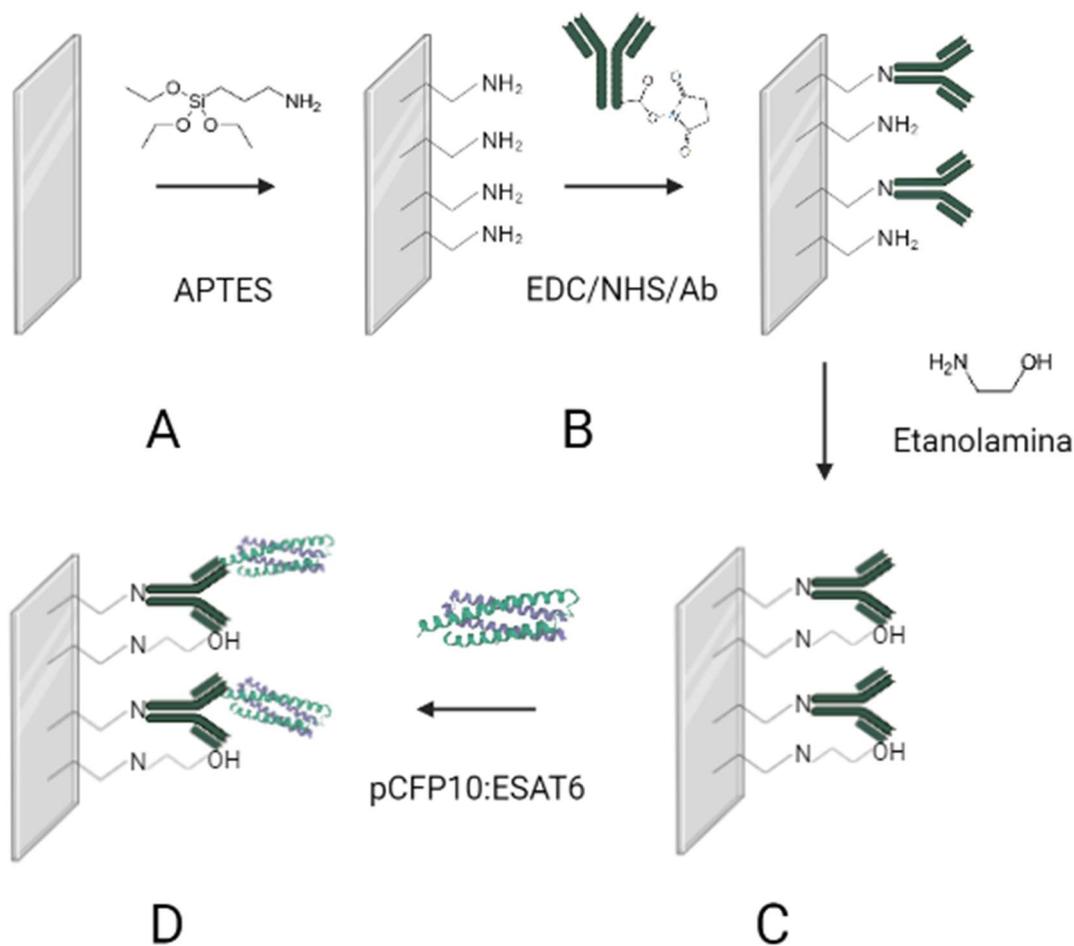


Figura 5 - Etapas de fabricação do imunossensor. A) Modificação da superfície do ITO com APTES. B) Imobilização do anticorpo monoclonal anti-CFP10. C) Bloqueio da superfície com ETA. D) Biorreconhecimento da proteína CFP10:ESAT6.

Fonte: Elaborada pela autora

A primeira etapa de fabricação do imunossensor consiste na funcionalização da superfície do ITO, através da imersão dos eletrodos em uma solução etanólica de APTES (2%, v/v) por 1h (Fig. 5A). O objetivo desta etapa é gerar grupos amino-terminal, que facilitam a ligação covalente com os anticorpos. Em seguida, os eletrodos são lavados com etanol e água ultrapura e imersos em uma solução EDC-NHS/anti-CFP10 de concentrações  $8 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  respectivamente, em PB, por 90 minutos (Fig. 5B). A solução EDC-NHS/anti-CFP10 foi preparada com antecedência e deixada reagir por 90 minutos, de modo a ativar os grupos carboxila-terminal dos anticorpos. Os eletrodos foram lavados em PB e água

para remover o excesso de AB fracamente ligados, e então imersos em solução de ETA ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por 1h (Fig. 5C). Por fim, após lavagem em PB, foi realizada a etapa de bioreconhecimento da proteína pelo imunossensor, através da imersão deste em uma solução pCFP10:ESAT6 ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) durante 1h (Fig. 5D). Para garantir que a área eletroquimicamente ativa permaneça constante, a imersão dos eletrodos foi realizada em tubos eppendorf de  $1500 \mu\text{L}$ , utilizando  $500 \mu\text{L}$  de cada solução. Todos os experimentos foram realizados a  $21^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.2 Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas no Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 302N AUTOLAB® equipado com os softwares GPES 4.9 e FRA 4.9.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de três eletrodos convencional. Lâminas de vidro revestidas com óxido de estanho e índio (ITO) foram utilizados como eletrodos de trabalho. Os eletrodos de Ag/AgCl (saturado em KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ) e platina (de área  $1 \text{ cm}^2$ ) foram utilizados respectivamente como eletrodo de referência e contraeletrodo. Estas medidas foram utilizadas para caracterizar as etapas de modificação e imobilização, durante a construção e otimização do imunossensor, em solução contendo o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ , PB, pH 7,4).

Voltametria cíclica foi utilizada em uma taxa de varredura (scanning rate) de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , e potencial variando entre 200 e 1000 mV. Para medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, um sinal sinusoidal com amplitude de 10 mV foi aplicado sobre o potencial de célula aberta (OCP) em uma faixa de frequência entre 0,1 e 10.000 Hz. O software FRA 4.9 foi utilizado para ajustar a expressão do circuito equivalente sobre os pontos experimentais, retornando valores de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ), representados pelo diâmetro do semicírculo no Gráfico de Nyquist ( $-Z''$  vs.  $Z'$ ), nos espectros de EIE.

#### 4.2.3 Estudos de otimização dos imunossensores

Foram realizados estudos de otimização dos parâmetros de construção do imunossensor, com o objetivo de obter as condições ótimas de medidas eletroquímicas em cada etapa de fabricação, conforme descrito abaixo:

- Variação do tempo de bloqueio com etanolamina 100 mmol L<sup>-1</sup> em 15, 30, 45 e 60 minutos, mantendo os demais parâmetros constantes;
- Variação da concentração de etanolamina na etapa de bloqueio em 50, 100 e 150 mmol L<sup>-1</sup>, mantendo os demais parâmetros constantes;
- Variação do tempo de incubação do EDC/NHS/anti-CFP10 (em concentração fixa) no eletrodo modificado com APTES em 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, mantendo os demais parâmetros fixos;
- Variação da concentração do anticorpo anti-CFP10 em 5 µg mL<sup>-1</sup>, 10 µg mL<sup>-1</sup>, 15 µg mL<sup>-1</sup> e 20 µg mL<sup>-1</sup>, mantendo as concentrações de EDC e NHS e os demais parâmetros fixos e
- Variação do tempo de imersão do eletrodo na solução de pCFP10:ESAT6 em 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, mantendo fixos os demais parâmetros analisados.

Após definir o parâmetro ótimo, este passou a ser utilizado em cada etapa subsequente. Portanto, na última etapa, isto é, da variação do tempo de bioreconhecimento da proteína pelo imunossensor, todos os demais parâmetros utilizados foram os ótimos.

#### 4.2.4 Caracterização morfológica dos imunossensores eletroquímicos

A morfologia e rugosidade da superfície dos eletrodos foram avaliadas via AFM usando um microscópio de força atômica NanoSurf Flexa em *tapping mode* com frequência de ressonância de 190 KHz e amplitude de vibração de 200 mV. As imagens foram registradas em força dinâmica sob controle de umidade. O software Gwyddion foi utilizado para o tratamento das imagens.

Medidas de microespectroscopia Raman foram realizadas utilizando um sistema de microscópio confocal Raman inVia (Renishaw) A banda Raman de um substrato de silício em  $532\text{ cm}^{-1}$  foi usada para calibrar o espectrômetro. O laser (Kimmon Koha Co., Ltd. IK5552R-F) usado para excitação tem um comprimento de onda de 442 nm com uma grade de 1800 linhas  $\text{mm}^{-1}$  e uma potência de 5 mW foi usada para a medição. O tempo de aquisição de um espectro foi de 30 segundos e a média de 10 repetições foi usada para melhorar a redução de ruído nos dados medidos. Os espectros Raman foram obtidos de várias regiões diferentes dos eletrodos. O manejo e processamento dos dados foram realizados utilizando o software WiRE 5.4. Todas as medições foram realizadas em temperatura ambiente, a  $21^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.5 Cálculo das figuras de mérito dos imunossensores

Após otimização e caracterização dos imunossensores, foram realizados os cálculos das figuras de mérito, ou seja, curva analítica, sensibilidade, seletividade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), reprodutibilidade e repetibilidade. A curva analítica foi construída medindo-se os valores de  $R_{ct}$  em uma faixa de concentração de pCFP10:ESAT6 de 0,5 a 50  $\text{ng mL}^{-1}$ , e seguiu a equação abaixo:

$$\Delta R_{ct(\text{anti-CFP10.pCFP10:ESAT6})} = a + b * \log[\text{pCFP10:ESAT6}]$$

Equação 2 - Equação da curva analítica do imunossensor.

Onde  $\Delta R_{ct(\text{anti-CFP10.pCFP10:ESAT6})}$  é o valor relativo à transferência de carga após o reconhecimento da pCFP10:ESAT6,  $a$  e  $b$  são respectivamente os coeficientes linear e angular da reta, obtidos a partir do ajuste dos dados e  $[\text{pCFP10:ESAT6}]$  a concentração da pCFP10:ESAT6.

Para o cálculo de LOD e LOQ, foram realizadas medidas do imunossensor em 10 soluções de eletrólito suporte, isto é, após a etapa de bloqueio com etanolamina o eletrodo foi incubado apenas em PB, sem a pCFP10:ESAT6, de modo a observar apenas o sinal do eletrodo quando incubado em branco. Utilizou-se, então, as equações 3 e 4 (47):

$$LOD = \frac{3\sigma_{blk}}{b}$$

Equação 3 - Limite de detecção do imunossensor.

$$LOQ = \frac{10 \sigma_{blk}}{b}$$

Equação 4 - Limite de quantificação do imunossensor.

Onde  $\sigma_{blk}$  é o desvio padrão do branco.

A repetibilidade do imunossensor foi determinada realizando-se quatro medições intra-eletrodo, no mesmo dia, a cada 60 minutos (isto é, 0, 60, 120 e 180 minutos após incubação em pCFP10:ESAT6, mantido em câmara úmida), utilizando uma solução 4 ng mL<sup>-1</sup> de pCFP10:ESAT6. Para avaliar reprodutibilidade, foram realizadas quatro medidas intra-dias.

Por fim, realizou-se experimentos para testar a seletividade do imunossensor, utilizando as proteínas NS1 DENV e SARS-CoV-2 Spike como modelo, na concentração de décimo da concentração da proteína CFP10:ESAT6 nos estudos de otimização, isto é, 20 ng mL<sup>-1</sup>.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Modificação dos eletrodos

A ativação dos eletrodos ITO foi realizada utilizando a técnica VC, seguida das medidas de EIE após cada etapa de modificação durante a construção do eletrodo, ou seja, ITO/APTES, ITO/APTES/anti-CFP10 e ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6. Os voltamogramas cíclicos e os gráficos de Nyquist (de VC e EIE, respectivamente) são mostrados na Figura 6.

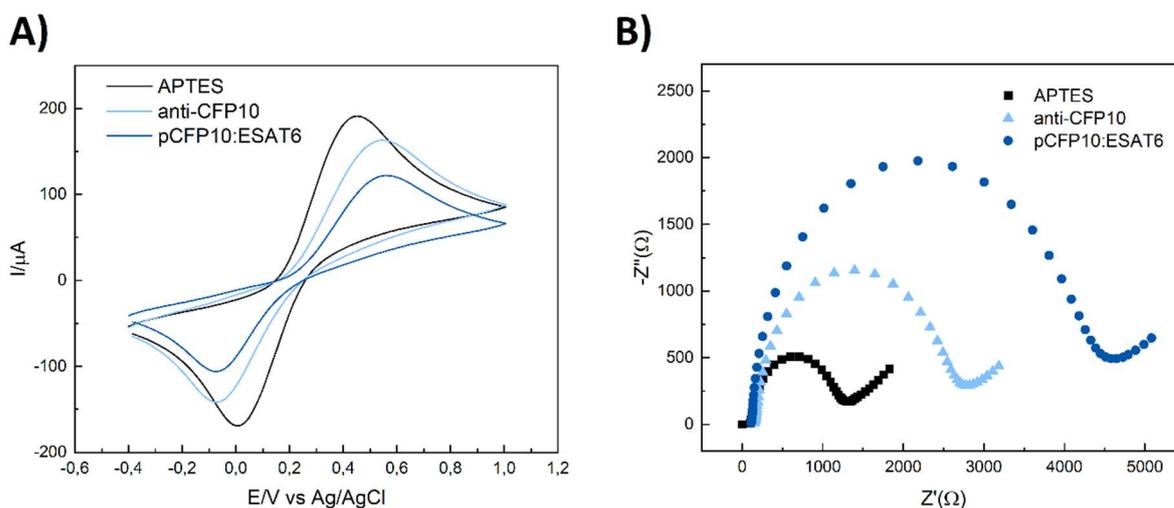


Figura 6 - Caracterização eletroquímica das principais etapas de construção do imunossensor para pCFP10:ESAT6. A) Voltamogramas cíclicos. B) Gráfico de Nyquist. (Preto) ITO/APTES, (Azul claro) ITO/APTES/EDC-NHS/anti-CFP10, (Azul) ITO/APTES/EDC-NHS/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6. Condições dos voltamogramas cíclicos:  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , -400 a 1000 mV vs. Ag/AgCl/3M KCl. Condições do Gráfico de Nyquist:  $a = 10 \text{ mV}$ ,  $f = 10 \text{ kHz}$  to  $10 \text{ mHz}$ , circuito aberto. Biorreconhecimento com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de anti-CFP10 e  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  of pCFP10:ESAT6 por 45 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora

Inicialmente, analisou-se o crescimento do filme na superfície do eletrodo através das medidas de VC (Fig. 6A). À medida em que cada etapa é realizada, espera-se um aumento no pico da corrente de  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e na diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico ( $\Delta E = E_{p_a} - E_{p_c}$ ), assim como nas correntes dos picos de oxidação ( $I_{p_a}$ ), dado que a deposição de moléculas com grande volume molecular (*i.e.*, anticorpos e proteínas) na superfície do eletrodo diminui a transferência de elétrons (47,48). O processo de funcionalização do ITO com a

solução de APTES promove a ligação covalente dos grupos silano na superfície do eletrodo. Observou-se um pico de  $452 \pm 9$  mV com corrente anódica de  $191 \pm 19$   $\mu$ A e uma diferença dos potenciais de pico de  $\Delta E = 0,444$  mV. Após as etapas de imobilização de anti-CFP10/EDC-NHS e bloqueio com ETA, observou-se um pico de  $547 \pm 7$  mV com uma diminuição da corrente anódica para  $163 \pm 58$   $\mu$ A e um aumento de  $\Delta E$  para 0,618 mV. Finalmente, após incubação da plataforma ITO/APTES/EDC-NHS/anti-CFP10 em uma solução  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  de pCFP10:ESAT6, o pico aumentou para  $562 \pm 14$  mV, a corrente anódica diminuiu para  $122 \pm 3$   $\mu$ A e houve um aumento em  $\Delta E$  para 0,638 mV. Estes resultados indicam, portanto, que houve crescimento adequado do filme após cada etapa de modificação.

Similarmente, os valores de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ), obtidos através da técnica EIE, são interpretados como a resistência da interface ôhmica e expressam a resistência da transferência de carga entre o eletrodo e a solução (48). Com base no modelo do circuito de Randles, o  $R_{ct}$  ajustado do EIE foi representado como o diâmetro do semicírculo no gráfico de Nyquist e usado para caracterizar a adsorção de biomoléculas na superfície do eletrodo, camada por camada (Fig. 6B). Após a funcionalização da superfície do ITO com APTES, o eletrodo exibiu  $R_{ct} = 1309 \pm 160$   $\Omega$ , o qual pode ser relacionado com a protonação das moléculas na superfície do ITO. Como APTES é positivamente carregado, o mediador eletroquímico  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , negativamente carregado, é atraído à superfície do eletrodo. Quando a camada anti-CFP10/EDC/NHS foi imobilizada na superfície do eletrodo, observou-se um aumento em  $R_{ct}$ , para  $2782 \pm 94$   $\Omega$ . Analogamente ao APTES, o anti-CFP10 é positivamente carregado, assim como a maioria dos anticorpos (49), atraindo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  à superfície do eletrodo. No entanto, foi observado um aumento em  $R_{ct}$ , devido ao grande volume molecular do anti-CFP10, o qual reduziu a transferência de carga. Ademais, o aumento em  $R_{ct}$  pode estar associado à repulsão eletrostática da superfície de carga negativa dos grupos carboxila, presentes em biomoléculas, os quais podem dificultar a transferência de elétrons do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  na superfície do eletrodo, bem como o desprendimento da dupla camada elétrica da superfície do eletrodo devido à modificação química da superfície, que também dificulta a transferência de elétrons. Após incubação do imunossensor na solução de pCFP10:ESAT6,  $R_{ct}$  aumentou para  $4600 \pm 91$   $\Omega$ , o que demonstra a grande afinidade entre as moléculas de antígeno e anticorpo, indicando que o sensor montado é

adequado para detecção de pCFP10:ESAT6. Portanto, ambas as técnicas VC e EIE corroboram com seus resultados, indicando uma modificação eficiente do eletrodo, para a construção do imunossensor e detecção da pCFP10:ESAT6.

## 5.2 Estudos de otimização dos imunossensores

Estudos de otimização foram realizados, com o intuito de obter as condições mais favoráveis de medidas eletroquímicas da etapa de imobilização do anti-CFP10 respectivo reconhecimento da proteína CFP10:ESAT6, isto é, quais condições resultavam em um valor mais alto de  $\Delta R_{ct_2}$ , a variação da resistência à transferência de carga antes de depois do bioreconhecimento da proteína. Para isto, os parâmetros analíticos concentração de ETA e tempo de imersão na etapa de bloqueio, efeitos da concentração de anticorpo e tempo de imobilização na conjugação anticorpo-proteína, e tempo de conjugação anticorpo-proteína foram analisados.

### 5.2.1 Tempo de bloqueio

Inicialmente, as plataformas ITO/APTES foram imersas em uma solução 100 mmol L<sup>-1</sup> de ETA, por 15, 30, 45 e 60 minutos, para avaliar o efeito do tempo de bloqueio na conjugação anticorpo-proteína, em busca do menor tempo. O valor de  $\Delta R_{ct_2}$ , que corresponde à diferença da resistência de transferência de carga do ITO antes e após a conjugação da proteína, aumentou de 358  $\Omega$  para 560  $\Omega$ , para 15 e 30 minutos, respectivamente. Entretanto, após 45 minutos,  $\Delta R_{ct_2}$  permaneceu em torno de 740  $\Omega$ , sugerindo estabilização do processo de bloqueio.

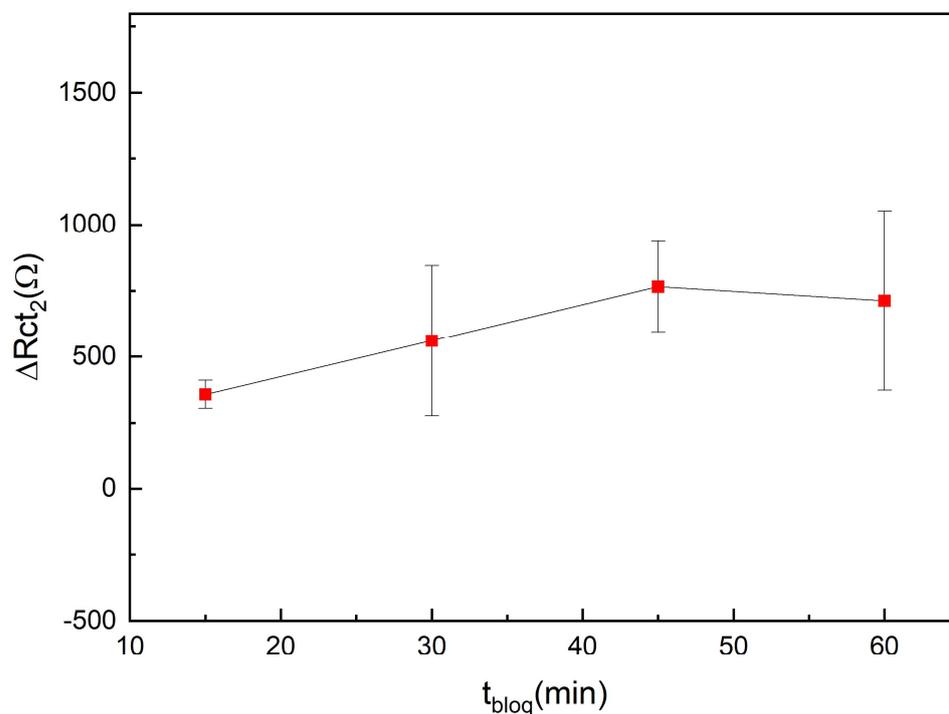


Figura 7 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de bloqueio com ETA em 15, 30, 45 e 60 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora

### 5.2.2 Concentração de etanolamina

Em seguida, a concentração de ETA na etapa de bloqueio foi avaliada. Os eletrodos foram imersos em solução de ETA nas concentrações 50, 100 e 150 mmol L<sup>-1</sup>, por 45 minutos. Observou-se um aumento de  $\Delta R_{ct_2}$  em duas vezes, de 659  $\Omega$  para 1141  $\Omega$ , de 50 para 100 mmol L<sup>-1</sup>. Acima desta concentração, para 150 mmol L<sup>-1</sup>, a variação da resistência de transferência de carga foi pequena, de apenas 40  $\Omega$ . Portanto, a concentração selecionada para os demais estudos foi 100 mmol L<sup>-1</sup>.

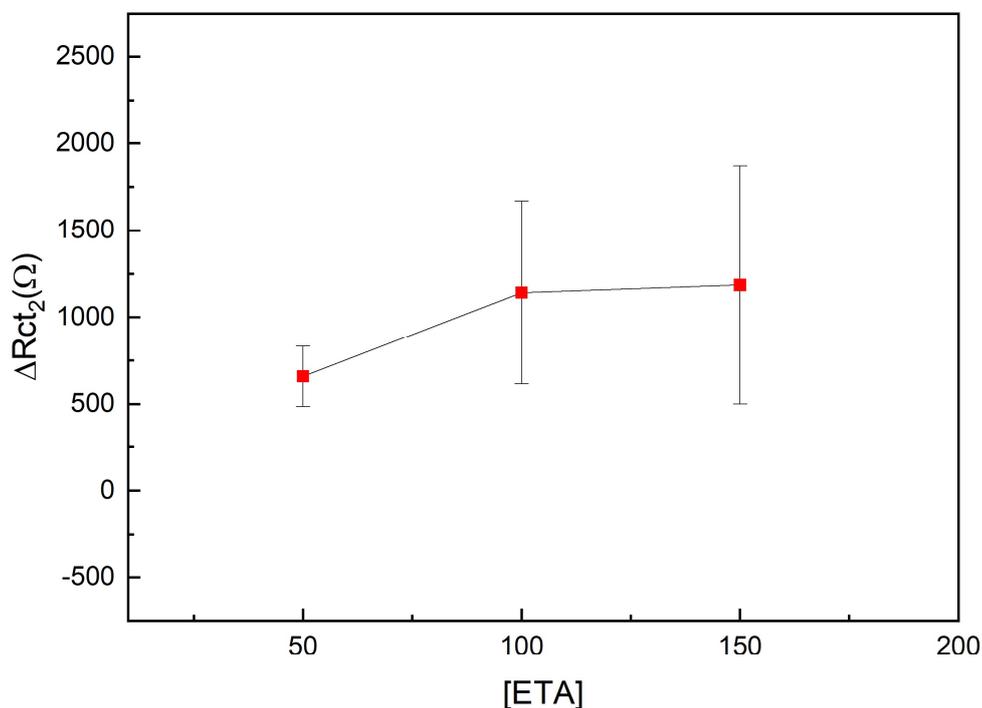


Figura 8 - Estudos de otimização do imunossensor, variando a concentração de ETA em 50, 100 e 150 mmol L<sup>-1</sup>.

Fonte: Elaborada pela autora

### 5.2.3 Tempo de imobilização de anti-CFP10

Testou-se, então, o tempo de imobilização de anti-CFP10/EDC/NHS nas plataformas de ITO modificadas. Os eletrodos foram imersos na solução contendo o anticorpo por 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Surpreendentemente, o valor mais alto de  $\Delta R_{ct_2}$  foi obtido com o menor tempo de imersão, 1279  $\Omega$  após 30 minutos. Depois, observou-se uma diminuição na resistência de transferência de carga, de 1205  $\Omega$  para 327  $\Omega$  em 45 e 60 minutos, seguido de um aumento de 567  $\Omega$  para 787  $\Omega$  em 90 e 120 minutos, respectivamente. Valores mais altos de  $\Delta R_{ct_2}$  indicam maior sensibilidade do sensor na detecção da proteína. Portanto, o tempo de imobilização escolhido foi 30 minutos.

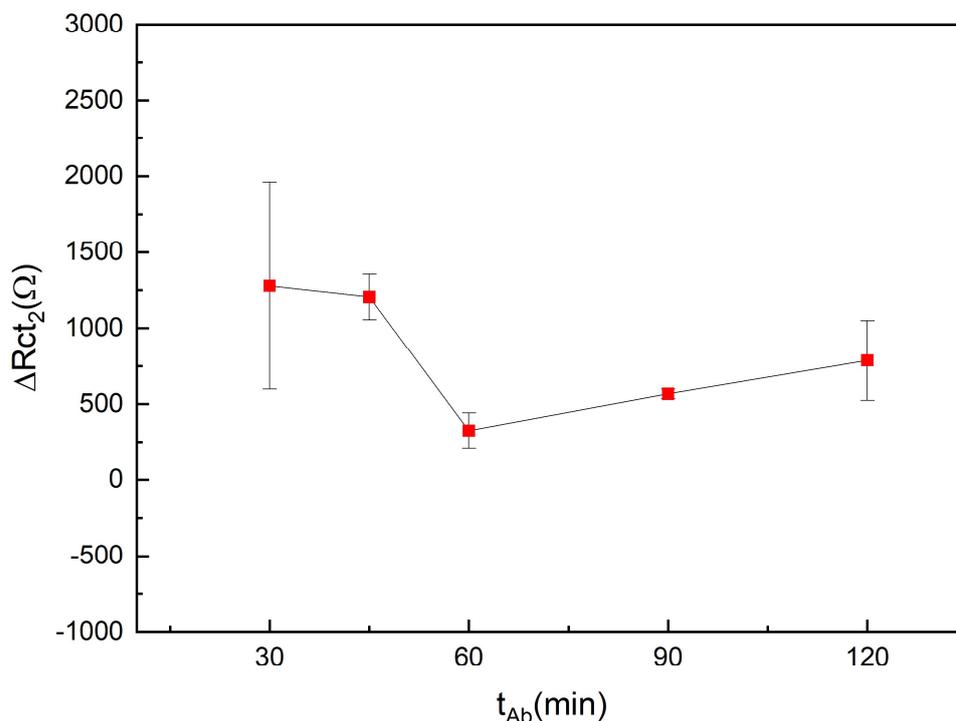


Figura 9 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de imobilização do anti-CPF10/EDC/NHS em 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora

#### 5.2.4 Concentração de anti-CPF10

A concentração de anti-CPF10 foi então variada em 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mantendo as concentrações de EDC e NHS constantes. Nesta etapa, a imersão dos eletrodos foi feita por 30 minutos. Observou-se um aumento linearmente proporcional na resistência de transferência de carga com o aumento da concentração de anti-CPF10, de 941  $\Omega$  para 1818  $\Omega$  em 5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Em seguida, na concentração de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , houve uma queda de  $\Delta R_{ct_2}$ , para 974  $\Omega$ , seguido de um aumento para 1420  $\Omega$ , na solução 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O valor mais alto de  $\Delta R_{ct_2}$  foi obtido para 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que sugere que concentrações mais altas do anticorpo conduzem a redução de sítios de ligação disponíveis no eletrodo de ITO, e à formação de uma estrutura de filme empacotada, a qual dificulta a adequada interação anticorpo-proteína.

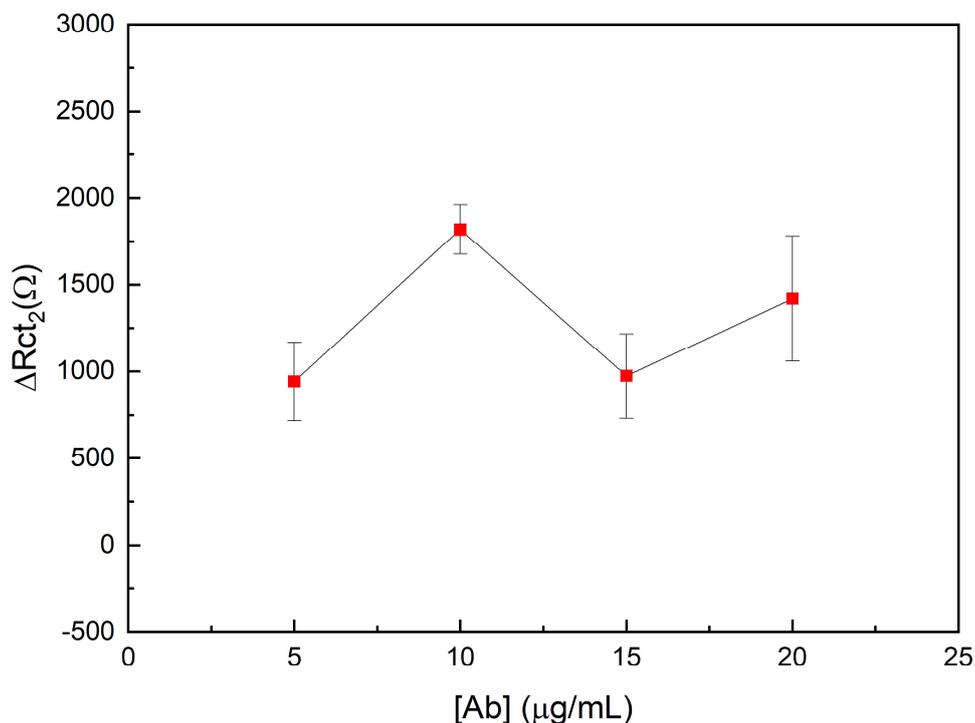


Figura 10 - Estudos de otimização do imunossensor, variando a concentração de anti-CFP10 em 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Fonte: Elaborada pela autora

#### 5.2.5 Tempo de interação anti-CFP10/pCFP10:ESAT6

Finalmente, o tempo ideal de interação do biossensor com a proteína CFP10:ESAT6 foi estudado. O biossensor foi imerso em uma solução  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  de pCFP10:ESAT6 por 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Inicialmente, observou-se uma diminuição de  $\Delta R_{ct_2}$  de  $586 \text{ } \Omega$  para  $344 \text{ } \Omega$  de 15 a 30 min, seguido de um aumento para  $534 \text{ } \Omega$  em 45 min. O valor mais elevado de  $\Delta R_{ct_2}$  foi  $1563 \text{ } \Omega$ , obtido após 60 minutos de imersão, seguido de uma diminuição para  $937 \text{ } \Omega$  em 90 minutos. Portanto, 60 minutos foi o tempo escolhido para dar continuidade aos estudos.

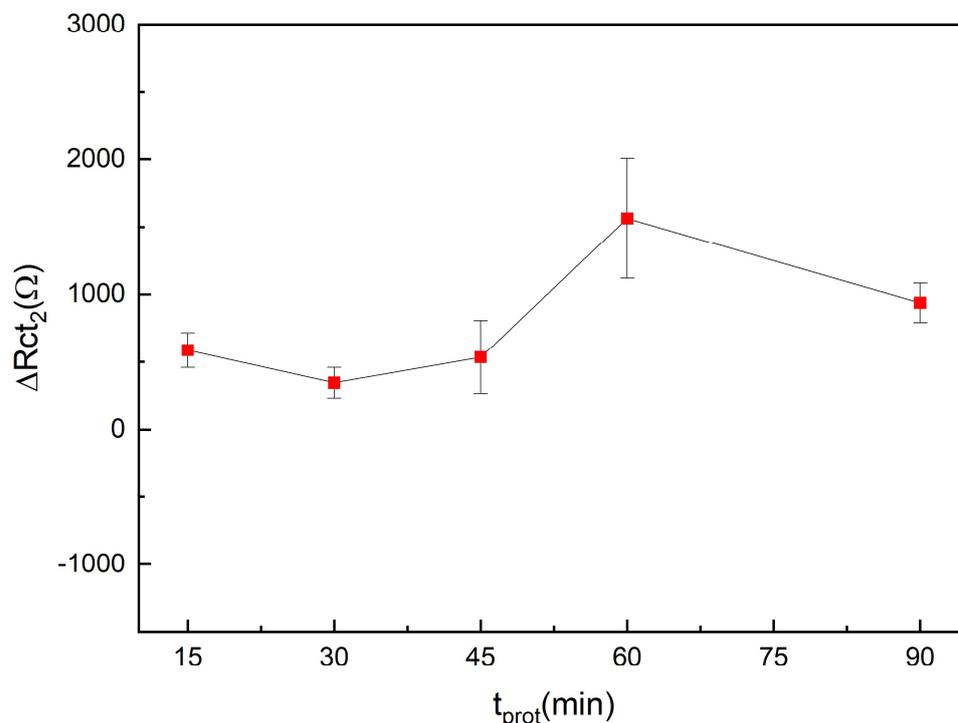


Figura 11 - Estudos de otimização do imunossensor, variando o tempo de interação anti-CFP10/pCFP10:ESAT6 em 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora

Deste modo, um ensaio completo para detecção de pCFP10:ESAT6 com características ótimas foi realizado em um tempo total de 4 horas, incluindo as medidas eletroquímicas após cada estágio de fabricação.

### 5.3 Caracterização dos imunossensores via microscopia Raman e AFM

A Figura 12 mostra o espectro Raman dos eletrodos após cada etapa de fabricação. O eletrodo de ITO não modificado apresentou picos em  $563\text{ cm}^{-1}$  e  $1096\text{ cm}^{-1}$ , uma curva típica consistente com o descrito na literatura (50). Após modificação com APTES, os principais modos vibracionais característicos do APTES foram observados: o pico em  $389\text{ cm}^{-1}$  é atribuído à vibração de flexão da ligação O-Si-O, o pico em  $640\text{ cm}^{-1}$  está relacionado ao alongamento esquelético da ligação C-N, o pico em  $1060\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento da ligação C-C próxima ao Si, a vibração de flexão da ligação Si-O-Si ocorre em  $1130\text{ cm}^{-1}$ , os picos entre  $1300$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$

estão relacionados principalmente às vibrações de CH<sub>2</sub> e CH<sub>2</sub> ligado ao Si, e o pico em 1605 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuído à vibração de flexão do NH<sub>2</sub> (51–53). Picos em 2850, 2880 e 3250 cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao estiramento simétrico CH<sub>2</sub>, vibração de estiramento dos grupos CH<sub>3</sub> e NH, respectivamente, também foram observadas (51,54).

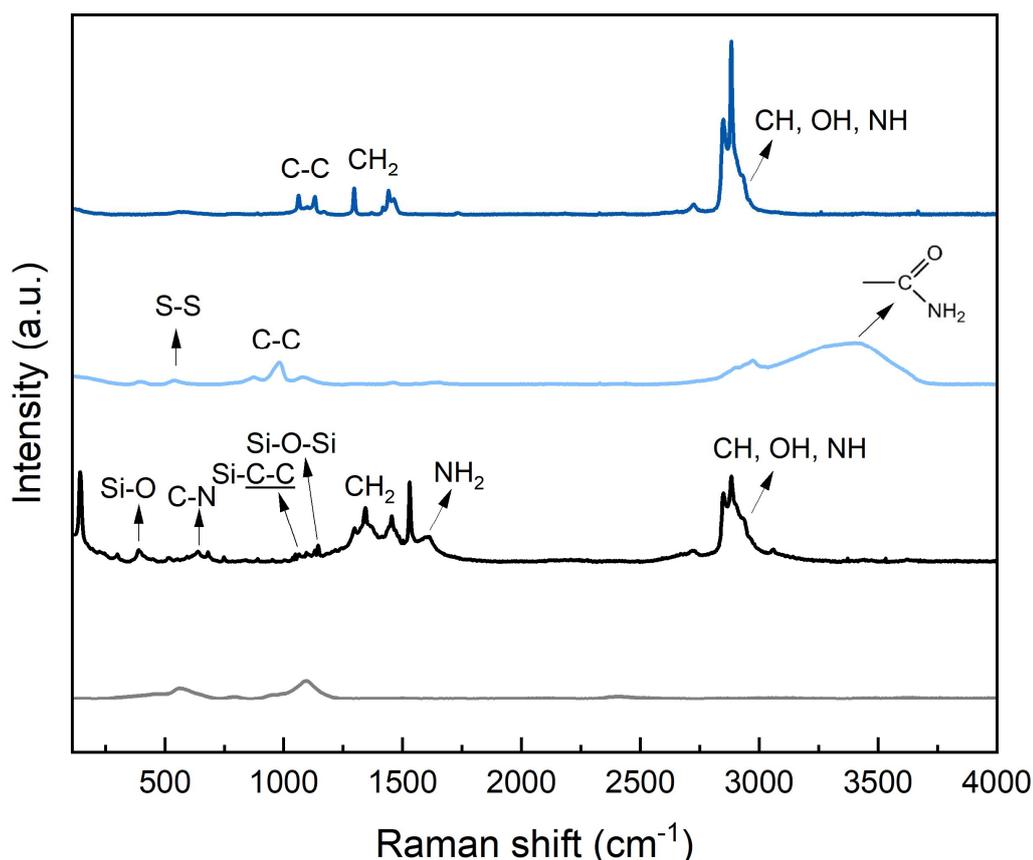


Figura 12 - Espectro Raman do ITO, ITO/APTES, ITO/APTES/anti-CFP10 e ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a imobilização do anti-CFP10, o espectro apresentou picos em 536, 874, 983 e 1077 cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao alongamento de dissulfeto S-S, alongamento C-C, alongamento C-C das folhas- $\beta$  da estrutura proteica e estiramento esquelético C-C, respectivamente, e um pico intenso entre 2750 e 3750 cm<sup>-1</sup>, que corresponde às vibrações de alongamento assimétrico dos grupos CH<sub>3</sub>, OH e NH das proteínas foram observados (55), consistentes com as estruturas de anti-CFP10, EDC e NHS. O espectro da pCFP10:ESAT6 foi caracterizado por alongamento esquelético C-C (1063

e  $1130\text{ cm}^{-1}$ ), deformação  $\text{CH}_2$  ( $1297$  e  $1442\text{ cm}^{-1}$ ) e pico entre  $2760$  e  $2980\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo à vibração de alongamento dos grupos  $\text{CH}$ ,  $\text{OH}$  e  $\text{NH}$  (55). Estas características espectrais são presentes nos espectros Raman de micobactérias, conforme relatado em (56). Os resultados obtidos mostram que a metodologia empregada foi bem sucedida em diferentes estágios da construção do imunossensor, com funcionalização adequadas dos grupos de interesse.

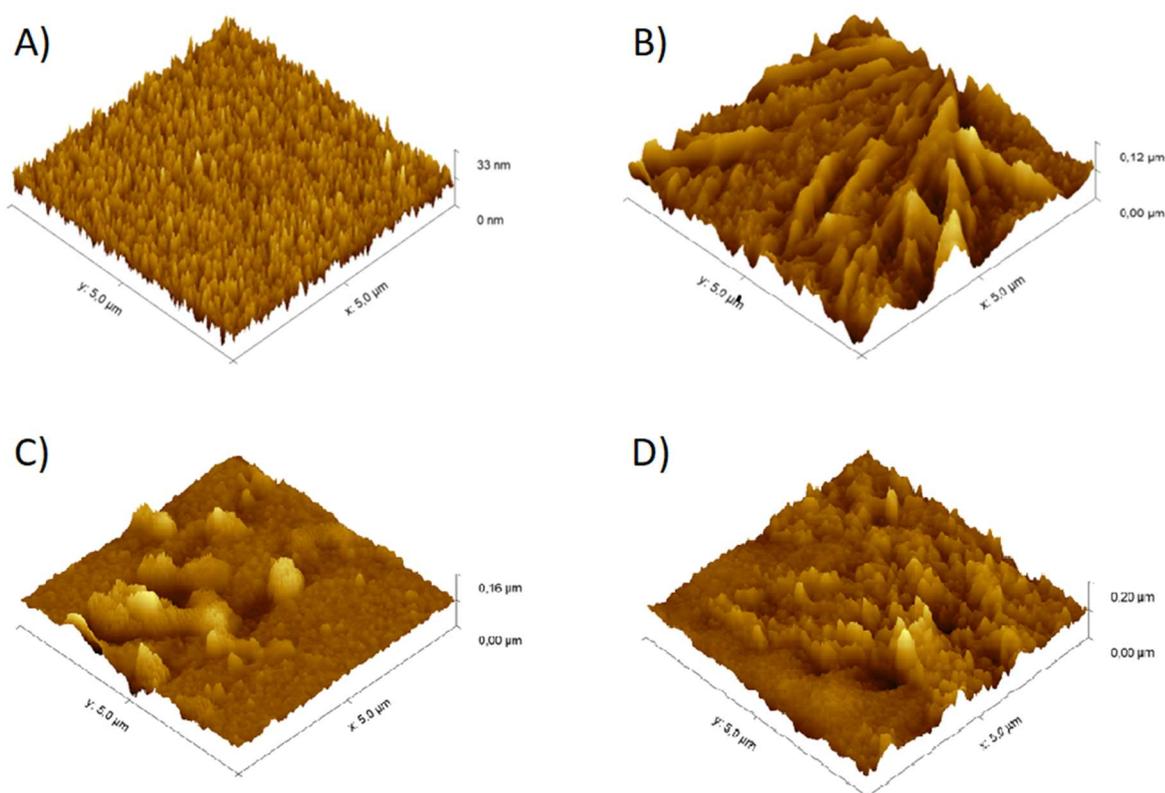


Figura 13 - Imagens 3D obtidas por AFM das superfícies de A) ITO. B) ITO/APTES. C) ITO/APTES/anti-CFP10. D) ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6.

Fonte: Elaborada pela autora

As morfologias e rugosidades dos eletrodos foram avaliadas utilizando microscopia de força atômica (AFM), conforme mostrado na Figura 13. A morfologia do ITO não modificado mostrou as estruturas granuladas da superfície do eletrodo (Fig. 16A). A superfície do eletrodo modificado com APTES, na Fig.16B, é significativamente diferente da anterior, indicando que a formação de uma monocamada de silano foi efetuada, o que alterou a topografia da superfície do eletrodo. Observa-se que os agregados de APTES estão homogeneamente

espalhados por toda a superfície, provavelmente devido ao aumento da polimerização do filme lateral de siloxano e à formação de uma rede (57). De modo similar, após imobilização do anticorpo na superfície do ITO e bioreconhecimento da proteína, foram observadas mudanças na superfície do eletrodo (Fig. 16C e 16D). Além disso, a rugosidade média quadrática (RMS) aumentou após cada estágio, conforme apresentado na Tabela 1, indicando a fabricação bem-sucedida do imunossensor.

Tabela 1 - Valores de rugosidade média quadrática (RMS) extraídos dos perfis correspondentes de AFM das superfícies do eletrodo.

	RMS (nm)
ITO	3,61
ITO/APTES	14,47
ITO/APTES/anti-CFP10	16,75
ITO/APTES/anti-CFP10/pCFP10:ESAT6	18,93

Fonte: Elaborada pela autora

#### 5.4 Cálculo das figuras de mérito dos imunossensores

A curva analítica foi obtida medindo-se os valores de  $\Delta R_{ct_2}$  em uma faixa de concentração de pCFP10:ESAT6 de 0,5 a 50 ng mL<sup>-1</sup>, e plotando estes valores em relação ao log [pCFP10:ESAT6] (Figura 14). Observou-se uma correlação linear e a curva analítica foi estabelecida com  $R^2 = 0,8938$ . A equação obtida a partir do ajuste foi a seguinte:

$$\Delta R_{ct_2} = (224 \pm 71) + (398 \pm 61) * \log [pCFP10:ESAT6]$$

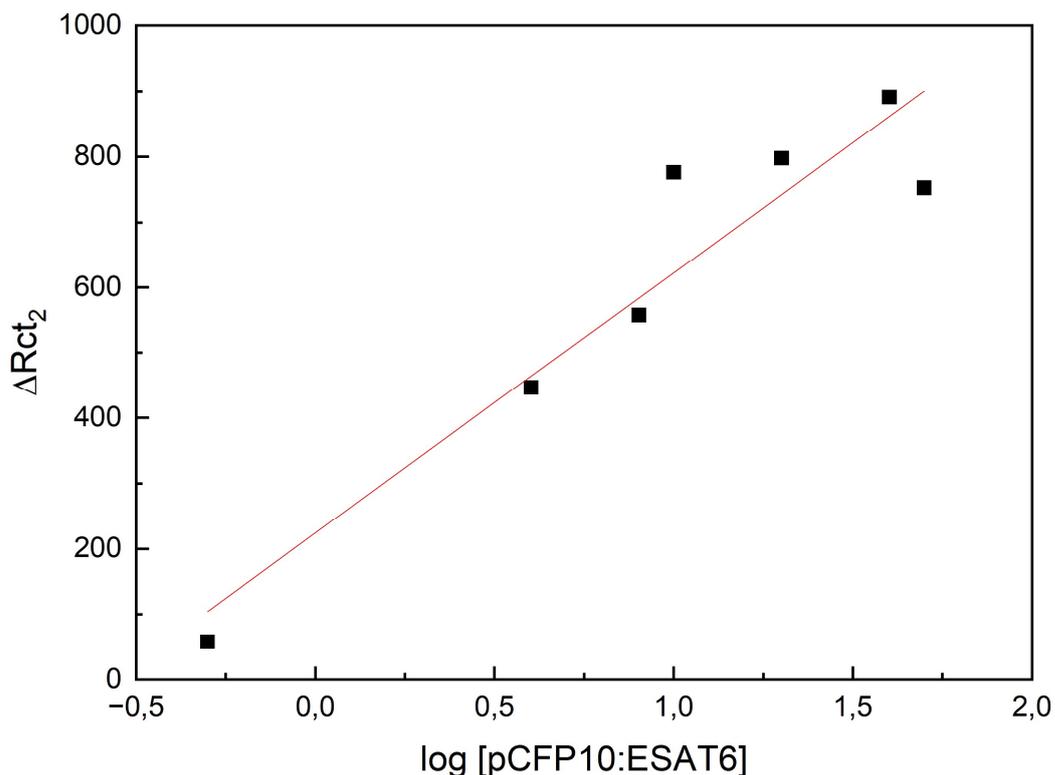


Figura 14 - Curva analítica dos eletrodos de ITO obtida variando a concentração de pCFP10:ESAT6 entre 0,5 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup>.

Fonte: Elaborada pela autora

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir da curva analítica, usando as equações 4 e 5:

$$LOD = \frac{3\sigma_{blk}}{(398 \pm 61)}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma_{blk}}{(398 \pm 61)}$$

O LOD e LOQ obtidos foram 1,25 ng mL<sup>-1</sup> e 4,18 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em seguida, realizou-se os experimentos de repetibilidade e reprodutibilidade. Os resultados de VC e EIE de repetibilidade são mostrados na Figura 15. Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade são mostrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.  $Rct_3$ ,  $Rct_4$ ,  $Rct_5$  e  $Rct_6$  são, respectivamente, o valor da resistência à transferência de carga após  $t = 0$ ,  $t = 60 \text{ min}$ ,  $t = 120 \text{ min}$  e  $t = 180 \text{ min}$  após o

bioreconhecimento da pCFP10:ESAT6. O desvio padrão relativo para repetibilidade e reprodutibilidade obtidos foram 9,5% e 18%, respectivamente, demonstrando que este imunossensor é adequado e preciso.

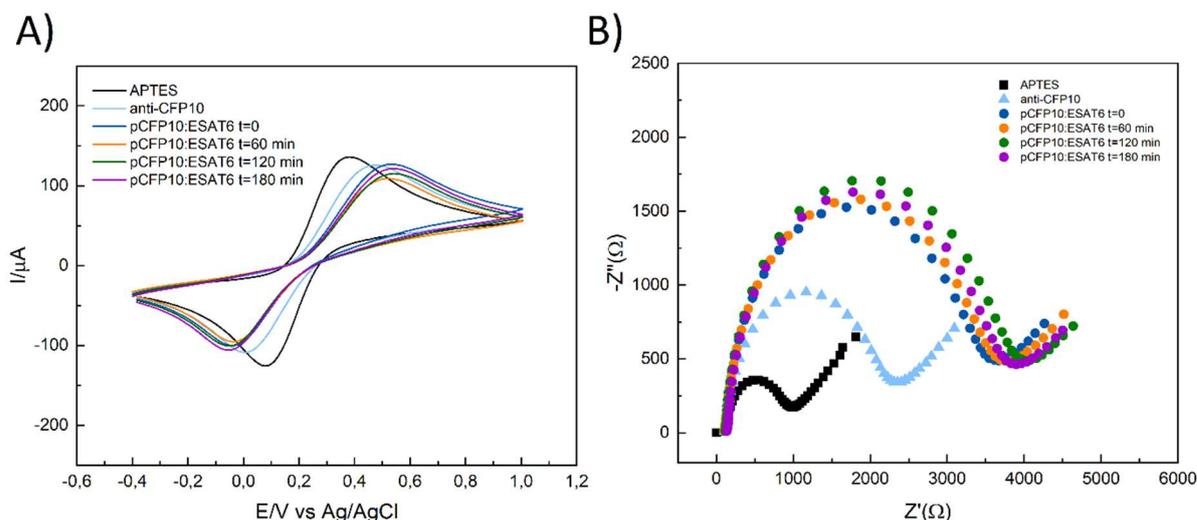


Figura 15 - A) Voltamograma cíclico e B) Gráfico de Nyquist da etapa de repetibilidade do imunossensor. [pCFP10:ESAT6] = 4 ng mL<sup>-1</sup>.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2 - Resultados dos experimentos de repetibilidade.

Eletrodo	$Rct_3(\Omega)$	$Rct_4(\Omega)$	$Rct_5(\Omega)$	$Rct_6(\Omega)$	Média	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
1	2881	3152	4155	4529	3679	788,16	21,42
2	3591	4385	4387	4321	4171	387,88	9,30
3	3701	3745	4753	3770	3992	507,97	12,72

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3 - Resultados dos experimentos de reprodutibilidade.

Eletrodo	1	2	3	4
$Rct_3(\Omega)$	432	1732	432	639
	Média	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)	
	501	92	18,36	

Fonte: Elaborada pela autora

Em seguida, realizou-se experimentos para testar a seletividade do imunossensor, utilizando as proteínas NS1 DENV e SARS-CoV-2 Spike, na concentração de 20 ng mL<sup>-1</sup>, a qual é um décimo da concentração da proteína

CFP10:ESAT6 nos estudos de otimização. Como mostrado na Figura 16, obteve-se  $\Delta R_{ct_2}$  de  $509 \pm 89 \Omega$  e  $376 \pm 127 \Omega$  para NS1 DENV e SARS-CoV-2 Spike, respectivamente. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a proteína CFP10:ESAT6 foi seletivamente detectada pelo imunossensor desenvolvido.

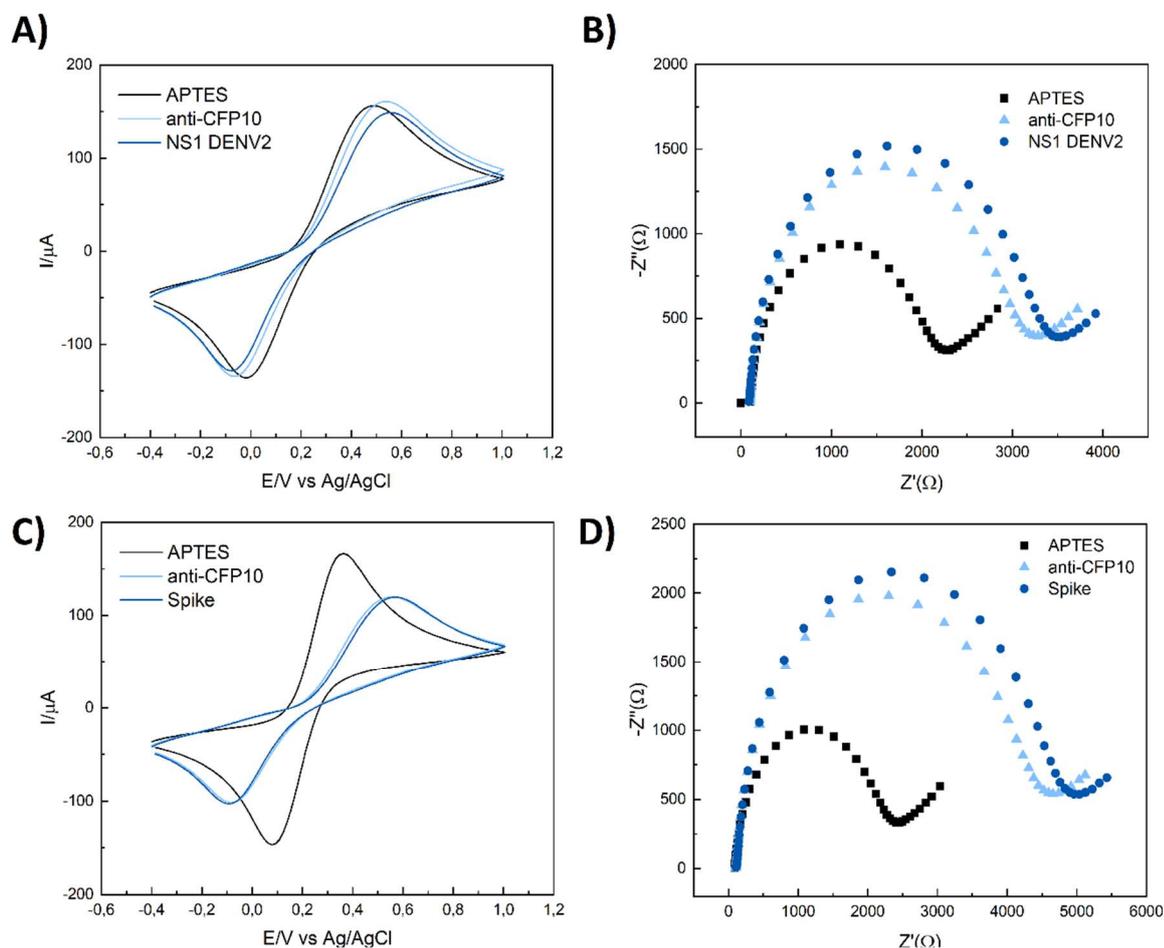


Figura 16 - A) Voltamograma cíclico e B) Gráfico de Nyquist do imunossensor utilizando a proteína NS1 DENV nos testes de seletividade; C) Voltamograma cíclico e D) Gráfico de Nyquist do imunossensor utilizando a proteína SARS-CoV-2 Spike nos testes de seletividade. [NS1 DENV] =  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  e [Spike] =  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Fonte: Elaborada pela autora

A tabela 4 mostra o desempenho analítico do imunossensor desenvolvido neste trabalho, comparado com outros métodos de detecção relatados na literatura, juntamente com os resultados.

Tabela 4. Testes rápidos e imunossensores para *M. tuberculosis*.

<b>Tipo</b>	<b>Molécula alvo</b>	<b>Princípio de funcionamento</b>	<b>Faixa de concentração</b>	<b>LOD</b>	<b>Ref.</b>	<b>Obs.</b>
Teste molecular rápido	DNA MTB	PCR em tempo real	-	19 CFU mL <sup>-1</sup>	(18)	Xpert® MTB/RIF Ultra (Cepheid)
	DNA MTB	PCR em tempo real	-	29 CFU mL <sup>-1</sup>	(20)	Truenat™ (Molbio)
Biossensor eletroquímico	ESAT6	Interação anticorpo-proteína	0,01-50µg mL <sup>-1</sup>	7,1 ng mL <sup>-1</sup>	(28)	Método de voltametria de onda quadrada
Biossensor eletroquímico	ESAT6	Interação anticorpo-proteína	1-100ng mL <sup>-1</sup>	1,0 ng mL <sup>-1</sup>	(29)	Biossensor reutilizável baseado em voltametria cíclica utilizando eletrodos de Ni-rGO-PANI
Óptico	ESAT6	Interação anticorpo-proteína	0,015-150 µg mL <sup>-1</sup>	1,5 µg mL <sup>-1</sup>	(30)	Sensor óptico baseado em cristal líquido
Aptasensor amperométrico	CFP10	Interação aptâmero-anticorpo	5,0-500 ng mL <sup>-1</sup>	1,22 ng mL <sup>-1</sup>	(31)	Quantificação do antígeno baseada em respostas da reação entre HRP e H2O2
Magneto forético	CFP10	Interação anticorpo-proteína	0,005-510 ng mL <sup>-1</sup>	1,8 pg mL <sup>-1</sup>	(32)	

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 5. Testes rápidos e sensores para *M. tuberculosis* (cont.).

<b>Tipo</b>	<b>Molécula alvo</b>	<b>Princípio de funcionamento</b>	<b>Faixa de concentração</b>	<b>LOD</b>	<b>Ref.</b>	<b>Obs.</b>
Biossensor eletroquímico	pCFP10:ESAT6	Interação anticorpo-proteína	10-500 ng mL <sup>-1</sup>	1,5 ng mL <sup>-1</sup>	(33)	Método de voltametria de pulso diferencial; Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Au MNPs do
Aptasensor eletroquímico	pCFP10:ESAT6	Interação anticorpo-proteína; ensaio sanduíche	5,0-500 ng mL <sup>-1</sup>	1,5 ng mL <sup>-1</sup>	(34)	
Biossensor eletroquímico	pCFP10:ESAT6	Interação anticorpo-proteína	0,5-50 ng mL <sup>-1</sup>	1,25 ng mL <sup>-1</sup>	Este trabalho	Método de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica

Fonte: Elaborada pela autora

A maior parte dos métodos citados tem como princípio de funcionamento a interação anticorpo-antígeno, caracterizando-se como imunossensores. A detecção é em sua maioria baseada nas técnicas de transdução eletroquímica (28,29,31,33), óptica (30) e magneto forético (32). Entre os imunossensores que detectam a pCFP10:ESAT6, o desenvolvido neste trabalho apresenta o limite de detecção mais baixo, além da faixa de concentração com limite inferior mais baixo, isto é,  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ . Além disso, comparado com o imunossensor desenvolvido neste trabalho, os outros métodos ainda requerem amplificação em várias etapas, são trabalhosos e demorados e utilizam equipamentos pesados, o que obviamente limita seu uso para testes *point-of-care* em um ambiente com recursos extremamente limitados. Adicionalmente, ainda que o LOD do imunossensor desenvolvido tenha sido mais alto do que de diversos outros estudos listados na Tabela 4, este permanece dentro da faixa de interesse fisiológica para MTB, a qual é aproximadamente  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  em pacientes de TB (10).



## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho reportou o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico eletroquímico para biorreconhecimento da pCFP10:ESAT6 baseado em eletrodos de ITO para diagnóstico da tuberculose. O bioreconhecimento da proteína biomarcadora foi alcançado pela conjugação anticorpo-proteína mediante o anticorpo monoclonal anti-CFP10. O imunossensor detectou a pCFP10:ESAT6 em concentrações acima de  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ , com tempo total de ensaio de 4h, LOD e LOQ de  $1,25 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $4,18 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente. O dispositivo exibiu boa reprodutibilidade e repetibilidade, o que demonstrou sua adequação e precisão, bem como seletividade para a pCFP10:ESAT6 quando comparado aos ensaios utilizando as proteínas NS1 DENV e SARS-CoV-2 Spike. O pequeno volume utilizado e o curto período de tempo requerido para a obtenção dos resultados representam características excepcionais para aplicações *point-of-care* no futuro. Espera-se que os imunossensores desenvolvidos possam conduzir a testes de tuberculose mais acessíveis e eficientes.



## 7 PERSPECTIVAS

Como trabalhos a serem desenvolvidos a partir destes, sugere-se os seguintes:

- Conjugação dos anticorpos imobilizados com nanopartículas de ouro (AuNPs) para aumentar a sensibilidade e o limite de detecção dos imunossensores;
- Integração dos imunossensores com smartphone;
- Detecção multiplex: desenvolvimento de sensores capazes de detectar vários biomarcadores específicos de tuberculose simultaneamente, melhorando a precisão do diagnóstico e reduzindo o tempo necessário para análise de amostras;
- Plataformas de biossensores descartáveis: imunossensores eletroquímicos descartáveis, de baixo custo e facilmente produzidos em larga escala são uma promissora ferramenta de diagnóstico de uso único, reduzindo o risco de contaminação cruzada, sendo adequados para implantação em ambientes com recursos limitados e
- Aplicação de imunossensores eletroquímicos para monitorar a resposta ao tratamento e progressão da TB.



## REFERÊNCIAS

- 1 DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, v. 100, n. 11, p.1862-1870, 2006.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2021*. Geneva: WorldHealth Organization; 2021.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2022*. 2022. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363752/9789240061729eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- 4 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The end TB strategy*. Geneva: WHO, 2015.
- 5 ACHARYA, B. *et al.* Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Biology Reports*, v. 47, p. 4065-4075, 2020.
- 6 LEE, H. J. *et al.* Multicenter testing of a simple molecular diagnostic system for the diagnosis of mycobacterium tuberculosis. *Biosensors*, v. 13, p. 259-271, 2023.
- 7 CANCINO-BERNARDI, J.; MARANGONI, V. S.; FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTO, V. Detection of leukemic cells by using Jacalin as the biorecognition layer: a new strategy for the detection of circulating tumor cells. *ChemElectroChem*, v. 2, n. 7, p. 963-969, 2015.
- 8 LAMBRIANOU, A.; DEMIN, S.; HALL, E. A. H. Protein engineering and electrochemical biosensors. In: RENNEBERG, R.; LISDAT, F. (ed.). *Biosensing for the 21st century*. Berlin: Springer, 2007. p. 65-95. (Advances in biochemical engineering/biotechnology)
- 9 WU, J. *et al.* Device integration of electrochemical biosensors. *Nature Reviews Bioengineering*. *Nature Reviews Bioengineering*, v. 1, p. 346, 2023; DOI:10.1038/s44222-023-00032-w.
- 10 BAKHORI, N. M. *et al.* Surface enhanced CdSe/ZnS QD/SiNP electrochemical immunosensor for the detection of mycobacterium tuberculosis by combination of CFP10-ESAT6 for better diagnostic specificity. *Materials*, v. 13, n. 1, p. 149, 2019.

- 11 GUTIERREZ, M. C. *et al.* Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. ***PLOS Pathogens***, v. 1, n. 1, p. 55-61, 2005.
- 12 HIRSH, AE, *et al.* Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 101, n. 14, p. 4871-4876, 2004. DOI:1073pnas.0305627101.
- 13 KIAZYK, S.; BALL, T. Latent tuberculosis infection: an overview. ***Canada Communicable Disease Report***, v. 43, n. 3-4, p. 62-66, 2017.
- 14 HOUBEN, R. M. G. J. DODD, P. J. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. ***PLOS Medicine***, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2016.
- 15 BEHR, M. A.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Is mycobacterium tuberculosis infection life long? ***BMJ***, v. 367, p. 1-7, 2019. OI:0.1136/bmj.l5770.
- 16 EMERY, J. C. *et al.* Self-clearance of *Mycobacterium tuberculosis* infection: Implications for lifetime risk and population at-risk of tuberculosis disease. ***Proceedings of the Royal Society B: biological sciences***, v. 288, n. 1943, 2021.
- 17 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment?* 2022 update. Geneva: WHO, 2022.
- 18 LAWN, S. D.; NICOL, M. P. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. ***Future Microbiology***, v. 6, n. 9, p. 1067-1082, 2011.
- 19 AO, W. *et al.* Rapid detection of *rpoB* gene mutations conferring rifampin resistance in *mycobacterium tuberculosis*. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 50, n. 7, p. 2433-2440, 2012.
- 20 NIKAM, C. *et al.* Rapid diagnosis of *mycobacterium tuberculosis* with Truenat MTB: a near-care approach. ***PLoS One***, v. 8, n. 1, p.51121, 2013.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection*, 2021 update. Geneva: WHO, 2021.
- 22 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF ultra-compared to Xpert MTB/RIF?* Geneva: WHO, 2017.

- 23 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim epidemiológico de tuberculose*. Brasília, 2022.
- 24 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 102, n. 1, p.29-45, 1962.
- 25 SHARMA, H.; MUTHARASAN, R. Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins. *Sensors & Actuators B: chemical*, v. 183, p. 535-549, 2013.
- 26 MUNGROO, N.; NEETHIRAJAN, S. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry—a review. *Biosensors*, v. 4, n. 4, p. 472-493, 2014.
- 27 DIOUANI, M. F. *et al.* Detection of ESAT-6 by a label free miniature immunoelectrochemical biosensor as a diagnostic tool for tuberculosis. *Materials Science and Engineering C*, v. 74, p. 465-470, 2017.
- 28 LAND, K.J. *et al.* REASSURED diagnostics to inform disease contro strategies, strengthen health systems and improvide patient outcomes. *Nat. Microbiology*, v.4, n.1, p.46-54, 2018.
- 29 GANGULY, N. *et al.* Mycobacterium tuberculosis secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CPF10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunology Cell Biology*, v.86, n.1, p.98-106, 2008.
- 30 OMAR, R. A.; VERMA, N.; ARORA, P. K. Development of ESAT-6 based immunosensor for the detection of mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.653853.
- 31 KIM, H. J.; RIM, J.; JANG, C. H. Diagnosis of tuberculosis using a liquid crystal based optical sensor. *Macromolecular Research*, v. 24, n. 2, p. 123-130, 2016.
- 32 YUNUS, M. H. *et al.* A novel amperometric aptamer-antibody sandwich assay for the detection of tuberculosis with diazonium electrografted enhanced modified electrode. *IEEE Sensors Journal*, v. 21, n. 20, p. 22442-22449, 2021.
- 33 KIM, J. *et al.* Plastic-chip-based magnetophoretic immunoassay for point-of-care diagnosis of tuberculosis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 8, n. 36, p. 23489-23497, 2016.

- 34 AZMI, U. Z. M. *et al.* Portable electrochemical immunosensor for detection of Mycobacterium tuberculosis secreted protein CFP10-ESAT6 in clinical sputum samples. ***Microchimica Acta***, v. 188, 2021. DOI: 10.1007/s00604-020-04669-x.
- 35 AZMI, U. Z. M. *et al.* Aptasensor for the detection of mycobacterium tuberculosis in sputum utilising cfp10-esat6 protein as a selective biomarker. ***Nanomaterials***, v. 11, p. 2446-2460, 2021.
- 36 GIZELI, E.; LOWE, C. R. Immunosensors. ***Current Opinion in Biotechnology***, v. 7, p. 66-71, 1996.
- 37 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. ***Clinica Chimica Acta***, v. 314, n. 1-2, p. 1-26, 2001.
- 38 CRISTEA, C.; FLOREA, A.; TERTIS, M.; SANDULESCU, R. Immunosensors. *In: Biosensors - micro and nanoscale applications*. Rijeka: InTech; 2015. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biosensors-micro-and-nanoscaleapplications/immunosensors>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- 39 LIANG, S. L.; CHAN, D. W. Enzymes and related proteins as cancer biomarkers: a proteomic approach. ***Clinica Chimica Acta***, v. 381, n. 1, p. 93-97, 2007.
- 40 MISTRY, K. K. *et al.* A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. ***Analyst***, v. 139, p. 2289-2311, 2014.
- 41 Wang, S. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy. ***Nature Reviews Methods Primers***, v. 1, n.1, p.41, 2021.
- 42 ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. ***Electrochemical impedance spectroscopy***. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley, 2017.
- 43 KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: critical survey of different architectures and transduction strategies. ***TrAC Trends in Analytical Chemistry***, v. 79, p. 88-105, 2016.
- 44 HOU, L. *et al.* Graphene oxide-labeled sandwich-type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4-chloro-1-naphthol oxidation. ***Biosensors and Bioelectronics***, v. 47, p. 149-156, 2013.
- 45 RUSHWORTH, J, V. *et al.* ***Impedimetric biosensors for medical applications***. New York: ASME Press; 2013.

- 46 RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*, v. 5, p. 1098-1115, 2013.
- 47 LVOVICH, V. F. *Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena*. New York: Wiley; 2012.
- 48 BRAZACA, L. C. *et al.* An antibody-based platform for melatonin quantification. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, v. 171, p. 94-100, 2018.
- 49 FREITAS, M. *et al.* Impedimetric immunosensors for the detection of Cry1Ab protein from genetically modified maize seeds. *Sensors & Actuators B: chemical*, v. 237, p.702-709, 2016.
- 50 BOSWELL, C. A. *et al.* Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chemistry*, v. 21, p. 2153-2163, 2010.
- 51 CHANDRASEKHAR, R.; CHOY, K. L. Innovative and cost-effective synthesis of indium tin oxide films. *Thin Solid Films*, v. 398-399, p. 59-64, 2001.
- 52 CHIANG, C. H.; ISHIDA, H.; KOENIG, J. L. The structure of  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 74, n. 2, p. 396-404, 1980.
- 53 SHIMIZU, I.; OKABAYASHI, H.; TAGA, K.; O'CONNOR, C. J. Raman scattering study of polyaminopropylsiloxane and its compounds for characterization of 3-aminopropylsilane-modified silica gel. Utility of the CH<sub>2</sub> rock and skeletal stretch modes. *Colloid and Polymer Science*, v. 275, p. 555-60, 1997.
- 54 SUN, Y. *et al.* Depth profiling of APTES self-assembled monolayers using surface enhanced confocal Raman microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 184, p. 1-6, 2017.
- 55 KRAFFT, C.; NEUDERT, L.; SIMAT, T.; SALZER, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 61, p. 1529-1535, 2005.
- 56 MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 42, p. 493-541, 2007.
- 57 STÖCKEL, S. *et al.* Raman spectroscopic identification of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biophotonics*, v. 10, p. 727-734, 2017.

58 WEIPING, Q. *et al.* Controlled site-directed assembly of antibodies by their oligosaccharide moieties onto APTES derivatized surfaces. ***Journal of Colloid and Interface Science***, v. 214, p.16-19, 1999.