

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ALESSANDRA FIGUEIREDO

Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do
vírus da dengue

São Carlos
2013

ALESSANDRA FIGUEIREDO

Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do
vírus da dengue

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. Francisco Eduardo
Gontijo Guimarães

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Figueiredo, Alessandra
Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue / Alessandra Figueiredo; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2013.
115 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Imunossensor. 2. Dengue. 3. NS1. 4. Diagnóstico precoce. I. Eduardo Gontijo Guimarães, Francisco , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

As minhas amigas de Poços de Caldas, Fernanda, Larissa, Michelli e Nara, agradeço por todo o crescimento juntas e amizade durante tantos anos;

Ao pessoal de São Carlos, especialmente ao Vinícius (Heisenberg), César, Bessa, David, Patrícia, Américo e Bruno (Zero), pela grande amizade e convivência, agradeço por ter conhecido todos vocês!

A galera da Academia Sport Winner, por terem me recebido tão bem, em especial o Mestre Edvaldo, que através do Taekwondo deu outro sentido a minha vida;

A minha mãe e as avós Luzia, Rosa e Angelina pela educação e sacrifícios para que eu pudesse concluir os estudos;

A Tia Margaretti e família, pela presença e todo o apoio;

Ao Thomas (Hermione) por ser meu companheiro todos os dias, por todo o incentivo, confiança e paciência;

Ao Prof. Francisco Guimarães, Prof. Valtencir Zucolotto e ao Dr. Nirton pela orientação e ao pessoal da empresa DNA Pta pela colaboração, sem as quais não teria realizado este trabalho;

Aos colegas de grupo, pela convivência diária e amizade;

A todos do IFSC que me ajudaram de alguma forma e a CAPES pelo apoio financeiro.

"Never forget what you are, for surely the world will not. Make it your strength. Then it can never be your weakness. Armor yourself in it, and it will never be used to hurt you."

George R. R. Martin em A Song of Ice and Fire

RESUMO

FIGUEIREDO, A. *Imunossensores potenciométricos para detecção da proteína NS1 do vírus da dengue.* 2013. p. 115 Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A dengue é uma doença negligenciada que carece de métodos diagnósticos rápidos nos primeiros dias de infecção. São quatro sorotipos diferentes, cuja monitoração é essencial para o controle da ocorrência de casos graves como a dengue hemorrágica. É urgente o desenvolvimento e disponibilização de um dispositivo capaz de suprir essa demanda, de modo que propomos a utilização de imunossensores potenciométricos, devido a facilidade de miniaturização e produção dos dispositivos e seu baixo custo, além da possibilidade de detecção direta (sem marcadores) e simplicidade de manuseio. Dispositivos sensores de pH, como o transistor de efeito de campo de porta estendida e separada (SEGFET) e amplificadores de instrumentação (AI) podem ser utilizados como transdutores de sinal para a reação antígeno-anticorpo, a partir da utilização de materiais não nernstianos, como o ouro, como plataforma sensível. A proteína NS1 do vírus da dengue é um excelente marcador da infecção, pois é secretada em altas concentrações pelo vírus no sangue de pessoas infectadas logo nos primeiros dias, de modo que o sistema preza pelo diagnóstico precoce da doença. Sua detecção é realizada através da imobilização de anticorpos anti-proteína NS1 na plataforma sensível, permitindo sua quantificação através da detecção da alteração local de carga. O eletrodo foi caracterizado por diversas técnicas de microscopia, entre elas de varredura, confocal e de força atômica, além da utilização de espectroscopia de impedância eletroquímica, permitindo um amplo conhecimento da superfície da membrana sensível. Os imunossensores desenvolvidos apresentaram alta sensibilidade, com capacidade de detecção da ordem de ng.mL^{-1} . Na região linear da curva analítica, foram obtidos sensibilidade correspondente a $(15.7 \pm 4.4) \cdot 10^{-4} \mu\text{A} \cdot \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o SEGFET e $(3.2 \pm 0.3) \text{ mV} \cdot \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o AI, sendo que este último apresenta uma maior estabilidade de sinal e dispensa a utilização de uma fonte variável de tensão, reduzindo o custo no desenvolvimento de um dispositivo diagnóstico comercial. Estes resultados levaram a um pedido de patente e o prosseguimento do projeto através da miniaturização do sistema e detecção em amostras reais.

Palavras-chave: Imunossensor. Dengue. NS1. Diagnóstico precoce.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, A. *Potentiometric immunosensors for the detection of NS1 protein of dengue virus.* 2013. p. 115 Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Dengue is a neglected disease that lacks fast diagnosis methods in the first days of infection. There are four different serotypes, which monitoring is essential to the occurrence control of severe cases as dengue hemorrhagic fever. The development of a device capable of fulfilling this demand is urgent, so we propose the use of potentiometric immunosensors, since its ease of miniaturization, mass production, low cost and the possibility of direct detection (label-free). pH sensor devices, as the separated extended gate field effect transistors (SEGFET) and instrumentation amplifiers (AI) can be applied as transducers to the antibody-antigen reaction by using non-nernstian materials such as gold as sensitive membrane. The non-structural 1 (NS1) protein is an excellent marker of infection, since its secreted in high concentration in the blood of infected people by the dengue virus in the first days, prioritizing early diagnosis. Its detection is made by immobilization of anti-NS1 protein antibodies, allowing its quantification by local charge changes. The electrode was characterized by many microscopy methods, including scanning electron, confocal and atomic force, besides electrochemistry impedance spectroscopy, providing a wide knowledge of the membrane surface. The developed immunosensors showed high sensitivity with detection capacity in the order of ng.mL^{-1} . In the linear range of the analytic curve, were obtained sensitivities of $(15.7 \pm 4.4) \cdot 10^{-4} \mu\text{A} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for the SEGFET and $(3.2 \pm 0.3) \text{ mV} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for the AI, whereas the latter has high signal stability spurring the use of a variable voltage source, minimizing the costs in the development of a commercial diagnostic device. These results led to a patent and the project continues by working in miniaturizing and real samples detection.

Keywords: Immunosensor. Dengue. NS1. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Distribuição mundial das áreas de risco de infecção para o ano de 2009. As linhas definem os limites de sobrevivência do mosquito <i>Aedes aegypti</i> durante o ano, representando áreas onde a transmissão do vírus da dengue é possível.....	32
Figura 2.2 -	Distribuição nacional das áreas de risco de infecção para o período entre 2001 à 2008.....	33
Figura 2.3 -	Dados relativos aos casos de dengue (preto) e aos óbitos devido à casos graves (DHF e DSS) (vermelho) no período de 2000 à 2011 no Brasil	34
Figura 2.4 -	Fêmea do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 2.5 -	Ciclo de infecção pelo DV. O vírus pode ser encontrado no organismo principalmente no período febril (viremia), juntamente com seu material genético (RNA) e o antígeno característico, a proteína NS1, este se estendendo até o final da fase crítica. A produção de anticorpos (IgM e IgG) se inicia na fase crítica e atinge o pico na fase de recuperação, permanecendo em níveis reduzidos no organismo até o caso de uma infecção secundária, quando seus níveis aumentam rapidamente para combater a doença.	36
Figura 2.6 -	Tipos de manifestações da infecção por vírus da dengue.....	37
Figura 2.7 -	(a) Estrutura cristalográfica do vírus da Dengue (3J27) e (b) sua morfologia.....	40
Figura 2.8 -	Representação do genoma do vírus e da poliproteína.....	41
Figura 3.1 -	Representação de um imunossensor padrão. O antígeno presente na amostra de interesse interage com o anticorpo imobilizado no transdutor, gerando um sinal que pode ser visualizado digitalmente...	43
Figura 3.2 -	(a) Representação de um anticorpo IgG, mostrando a região de ligação do antígeno (entre as cadeias leve e pesada) denominada F(ab') ₂ e a região de base do anticorpo Fc. (b) Estrutura cristalográfica de uma IgG humana, 1HZH.	46
Figura 3.3 -	Representação estrutural de uma imunoglobulina (a) IgG comparada com uma (b) IgY. O domínio constante e pesado nos anticorpos de aves é representado por Cv para facilitar a diferenciação entre a nomenclatura de mamíferos e aves.....	48

Figura 3.4 -	Secção transversal de um dispositivo N-MOS.....	49
Figura 3.5 -	Comportamento do transistor N-MOS nas seguintes situações: (a) acumulação, (b)depleção, (c) inversão e (d) região de triodo.....	50
Figura 3.6 -	Curvas características de um MOSFET. (a) Curva I_{DS} x V_{DS} para diversos valores de V_{GS} e (b) curva I_{DS} x V_{GS} , para um pequeno valor de V_{DS} (~200 mV).....	52
Figura 3.7 -	Estrutura de um ISFET. O eletrodo de porta de um MOSFET é substituído por um eletrodo de referência contido na solução eletrolítica em contato com o material isolante.....	53
Figura 3.8 -	Estrutura de um SEGFET, como proposto por Chi. Aplica-se uma tensão no eletrodo de referência e lê-se a resposta na membrana sensível conectada ao MOSFET comercial.....	53
Figura 3.9 -	Representação da constituição da dupla-camada: cargas superficiais (σ^0), camada de Stern ou Helmholtz (σ^1) e camada de carga difusa (σ^d).....	55
Figura 4.1 -	Etapas do processo de imobilização do anticorpo.....	63
Figura 4.2 -	(a) Multímetro Keithley 195A utilizado para medir tensão e corrente. Representação do (b) MOSFET CD4007UB e (c) AI INA 111 utilizados na fabricação de imunossensores.	64
Figura 4.3 -	Pinagem do MOSFET CD4007UB.....	65
Figura 4.4 -	Esquema do imunossensor utilizando o MOSFET CD4007UB.....	66
Figura 4.5 -	Pinagem do AI INA 111.	67
Figura 4.6 -	Esquema do imunossensor utilizando o AI INA 111.....	67
Figura 4.7 -	Gráfico da medida comparativa entre dois eletrodos de referência comerciais Analion modelo R-682, visando verificar a estabilidade dos eletrodos através da observação de tensão constante.....	69
Figura 4.8 -	Curva I_{DS} x V_{DS} característica do MOSFET.....	70
Figura 4.9 -	Tensão de saída (medida no pino 6) em função em função da tensão de entrada (aplicada no pino 3) do amplificador de instrumentação INA 111.....	71
Figura 4.10 -	Esquema de funcionamento de um AFM.....	73
Figura 4.11 -	Esquema simplificado de funcionamento de um microscópio confocal	74
Figura 4.12 -	Molécula de FITC.....	75

Figura 5.1 -	Imagens de MEV dos substratos de Au (a) antes e (b) depois da limpeza com etanol.	78
Figura 5.2 -	Imagens de AFM correspondente aos passos de imobilização: (a) substrato recoberto com Au, (b) Au-Cisteamina, (c) Au-Cisteamina-GA e (d) Au-Cisteamina-GA-Ab.....	79
Figura 5.3 -	Imagens de LSCM (a) da solução de anticorpo à 0.2 mg.mL^{-1} , (b) do substrato recoberto com cisteamina e dos filmes preparados através da imobilização de anticorpo utilizando (c) <i>dipping</i> e (d) <i>dropping</i>	81
Figura 5.4 -	Intensidades correspondentes ao corte transversal da imagem de fluorescência do método de imobilização por (a) <i>dipping</i> e (b) <i>dropping</i>	83
Figura 5.5 -	(a) Representação das etapas de imobilização através de EIS e (b) modelo de circuito equivalente representando os dados experimentais correspondentes ao sistema Au-Cis-GA-Ab.....	85
Figura 5.6 -	Curvas $I_{DS} \times V_{DS}$ para análise dos valores de V_{DS} e V_{GS} a serem utilizados no SEGFET, com V_{GS} variando entre (a) [0 , 5] V e (b) [0 , 1.5] V.	87
Figura 5.7 -	Curvas (a) $I_{DS} \times V_{DS}$ ($V_{GS} = 1.5 \text{ V}$) e (b) $I_{DS} \times V_{GS}$ ($V_{DS} = 0.1 \text{ mV}$) com os substratos recobertos com Au em tampão 0.1X PBS (pH 7.4) na configuração de SEGFET.	88
Figura 5.8 -	Curvas demonstrativas $I_{DS} \times$ Tempo da variação do pH para as regiões (a) ácida e (b) básica. Curvas da sensibilidade $I_{DS} \times$ pH para as regiões (c) ácida e (d) básica, mostrando a diferença entre o uso de substratos antes e após o processo de limpeza.....	90
Figura 5.9 -	Curvas demonstrativas Voltagem x Tempo da variação do pH para as regiões (a) ácida e (b) básica. Curvas da sensibilidade Voltagem x pH para as regiões (c) ácida e (d) básica, mostrando a diferença entre o uso de substratos antes e após o processo de limpeza.....	91
Figura 5.10 -	(a) Resposta temporal da adição de $0.5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína NS1 e (b) curva analítica.	96
Figura 5.11 -	(a) Eletrodos utilizados para imobilização do anticorpo, célula de medida (b) original e (c) fabricada na primeira etapa de miniaturização.	98
Figura 5.12 -	(a) Resposta temporal da adição de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína NS1 e (b) curva analítica.	100
Figura 5.13 -	Resposta do imunossensor à adição de interferentes (curva superior) e à adição da NS1 para efeito de comparação. A escala das ordenadas	

foi dividida para salientar os efeitos na resposta..... 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	Anticorpo
Abs	Absorbância
AFM	Microscopia de força atômica
Ag	Antígeno
BSA	Albumina do soro bovino
C	Capsídeo
CI	Circuito integrado
DENV-1	Dengue Vírus Sorotipo 1
DENV-2	Dengue Vírus Sorotipo 2
DENV-3	Dengue Vírus Sorotipo 3
DENV-4	Dengue Vírus Sorotipo 4
DF	Dengue clássica
DHF	Dengue Hemorrágica
DSS	Síndrome do choque por dengue
DV	Vírus da dengue
E	Envelope
$\varepsilon_{0.1\%}$	Coeficiente de extinção
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas
F(ab') ₂	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento adicional
FET	Transistor de efeito de campo
FITC	Fluoresceína
HSA	Albumina de soro humano
Ig	Imunoglobulina
ISFET	Transistor de efeito de campo íon seletivo
LSCM	Microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa Molecular
MOSFET	Transistor de efeito de campo metal óxido semicondutor
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

OCP	Potencial de circuito aberto
PA	Pureza analítica
pAb	Anticorpo policlonal
PB	Equação de Poisson-Boltzmann
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Protein Data Bank
prM	Proteína de membrana
RE	Retículo endoplasmático
RMS	Valor quadrático médio
RT-PCR	Transcrição reversa reação em cadeia da polimerase
SAM	Monocamada automontada
SAXS	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo
ssRNA	Ácido ribonucleico de fita simples
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

Si	Silício
SiO_2	Óxido de Silício
V_{GS}	Tensão na porta
V_{DS}	Tensão dreno-fonte
V_{FB}	Tensão de faixa-plana
I_{DS}	Corrente dreno-fonte
V_T	Tensão de Limiar
V_{SAT}	Tensão de Saturação
θ_M	Função trabalho do metal
θ_{Si}	Função trabalho do Silício
e	Carga elementar
Q_{SS}	Acúmulo de cargas na superfície do silício
Q_{Ox}	Acúmulo de cargas na interface óxido-silício
Q_B	Acúmulo de cargas na região de depleção do silício
C_{Ox}	Capacitância do óxido de porta
ϕ_f	Potencial de Fermi
W	Largura do canal
L	Comprimento do canal
μ	Mobilidade dos portadores no canal
NaCl	Cloreto de Sódio
KCl	Cloreto de potássio
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio monobásico
KH_2PO_4	Fosfato de potássio dibásico
BK7	Vidro
KMnO_4	Permanganato de potássio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Cr	Cromo
Au	Ouro
KOH	Hidróxido de potássio
E_{Ref}	Potencial no eletrodo de referência

χ_{Sol}	Potencial superficial de dipolo da solução
ψ	Potencial de superfície na interface óxido-eletrólito
R_H	Raio de Stokes-Einstein
R_G	Raio de giro
σ	Densidade superficial de carga
$\rho(x)$	Distribuição espacial de carga
z	Carga do íon
$n(x)$	Número de íons
k_B	Constante de Boltzmann
T	Temperatura
μ_q	Potencial químico
κ	Comprimento de Debye
R_S	Resistência da solução
R_{CT}	Resistência da transferência de carga
C_1	Capacitância da dupla-camada
C_2	Capacitância da difusão
R_{diff}	Resistência da difusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Objetivos	28
1.2	Organização da dissertação	29
2	PARTICULARIDADES SOBRE A DENGUE	31
2.1	Histórico: A dengue no Brasil e no mundo	31
2.2	Caracterização da doença	35
2.3	Diagnóstico clínico e laboratorial	38
2.4	O vírus da dengue e a proteína NS1	39
3	IMUNOSSENSORES POTENCIOMÉTRICOS	43
3.1	Elemento ativo do imunossensor: Anticorpos	45
3.2	Transistor de efeito de campo	48
3.3	Potencial de circuito aberto	54
4	MATERIAS E MÉTODOS	61
4.1	Reagentes	61
4.2	Limpeza e preparação dos substratos	62
4.3	Método de imobilização do anticorpo	63
4.4	Configuração experimental do imunossensor	64
4.4.1	Configuração do SEGFET	64
4.4.2	Configuração utilizando AI	66
4.5	Calibração dos sistemas de medida	68
4.6	Técnicas de caracterização da membrana sensível	71
4.6.1	Microscopia eletrônica de varredura	72
4.6.2	Microscopia de força atômica	72

4.6.3 Microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser	73
4.6.3.1 Protocolo de marcação de anticorpos	74
4.6.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 Caracterização da membrana sensível	77
5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura	77
5.1.2 Microscopia de força atômica	79
5.1.3 Microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser	80
5.1.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica	84
5.2 Aplicação das plataformas como sensores de pH	86
5.3 Imunossensores amperométricos para detecção de NS1	92
5.4 Imunossensores voltanométricos para detecção de NS1	97
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	103
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes obstáculos para os chamados países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento são as conhecidas doenças negligenciadas, que afetam severamente a população de áreas tropicais e subtropicais. Este conjunto de doenças prevalece em condições de pobreza, contribuindo para a manutenção do quadro de desigualdades. Constitui este grupo doenças como a dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras (1). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, devido principalmente a condições sanitárias precárias, como água contaminada e más condições de habitação (1). Apesar do número significativo, existe grande dificuldade de avanço nas pesquisas nessa área, devido à falta de investimento por parte da indústria farmacêutica, seja no desenvolvimento de novos fármacos ou métodos de diagnósticos. Este fato se deve ao retorno financeiro reduzido, uma vez que a maior parte da população atingida é de baixa renda (1).

A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus do gênero *Flavivírus*, pertencente à família *Flaviviridae*, transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, podendo em determinados casos apresentar formas mais graves como a dengue hemorrágica (DHF, do inglês *dengue hemorrhagic fever*) e a síndrome do choque por dengue (DSS, do inglês *dengue shock syndrome*), que pode levar à morte do paciente. Devido à possibilidade de ocorrência de epidemias, o controle do mosquito é de extrema importância, devendo ser tomado um cuidado especial durante o verão e período de chuvas (1-2).

A introdução do vírus da dengue no país se deu em torno de 1840 e desde então a população brasileira sofre com ciclos peródicos de epidemias (2). Em 2012 foram quase 600 mil casos registrados e o primeiro trimestre de 2013 já apresenta um aumento, que varia de acordo com a região, de 20 à 75% nos casos com relação ao mesmo período no passado (3-5), são quase 14 mil casos confirmados apenas na cidade de Belo Horizonte (6-7). Ainda não há tratamento específico para a dengue, apenas um tratamento paliativo para os sintomas, sendo seu diagnóstico realizado clinicamente baseado nos sintomas e exame físico.

Existe a possibilidade de diagnóstico através do teste ELISA (Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*), isolamento viral ou detecção de RNA através de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR). Entretanto, esses métodos são ainda custosos e requerem o

treinamento de pessoal, fato que inviabiliza a implementação como exame de rotina nos postos de saúde.. Além disso, a dengue pode ser facilmente confundida com outras enfermidades, como por exemplo gripe, rubéola, sarampo e outras infecções virais e bacterianas (2). O Ministério da Saúde possui um conjunto de normas e diretrizes de orientação para que os profissionais da saúde saibam como direcionar melhor os pacientes, no entanto há muitos casos de cura natural da doença sem a procura por unidades de saúde ou devido a demora na realização dos procedimentos (8).

De acordo com a literatura, nos últimos anos vem sendo realizados alguns trabalhos com o objetivo de diagnóstico do vírus da dengue, principalmente através de métodos de impedância (9-10), entre outros (11-12). É importante notar que vem sendo priorizada a detecção precoce em relação a detecção de anticorpos, de modo que o presente trabalho segue esta tendência, focando-se na proteína não estrutural 1 (NS1) (13).

Tendo em vista o contexto supracitado e a incipiente tecnologia existente referente ao desenvolvimento de métodos rápidos e práticos para o diagnóstico da dengue, afinal, um diagnóstico precoce é sempre recomendado no tratamento de qualquer enfermidade, o presente trabalho propõe a utilização de um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico desta doença, através da detecção da proteína NS1 do vírus da dengue, que se comporta como um excelente marcador da infecção em sua fase aguda (14), ou seja, o período de viremia quando há material genético do vírus (RNA) e antígeno (proteína NS1) presentes no sangue (15). Os anticorpos começam a ser produzidos depois de cerca de 10 dias após a incubação, ponto a partir do qual o organismo volta a se estabilizar, ou seja, o vírus é combatido fazendo com que a concentração de proteína e RNA sejam reduzidos rapidamente, limitando o diagnóstico precoce até o início da produção de anticorpos.

Imunossensores constituem uma classe de biossensores baseados na afinidade antígeno-anticorpo, cuja a reação imunoquímica é detectada e o sinal medido por um transdutor (16). A base de qualquer imunossensor é a especificidade do reconhecimento molecular de抗ígenos por anticorpos para formar um complexo estável. Este tipo de dispositivo é definido de acordo com o método de detecção. Os principais são: eletroquímicos (amperométrico, voltamétrico, etc), óticos (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*), micro gravimétricos e termométricos (16-17).

Pesquisas recentes no IFSC mostraram a eficácia de sensores potenciométricos utilizando superfícies sensoras à base de óxidos semicondutores, tais como ITO (18) e TiO₂ (19) e filmes automontados (20). Por isso, optamos por utilizar imunossensores eletroquímicos, em especial os potenciométricos, uma vez que existe facilidade na sua

miniaturização e processo de microfabricação, além do baixo custo e simplicidade da medida, uma vez que dispensa a utilização de marcadores (21-23). Optamos pela construção de uma plataforma sensível à interação antígeno-anticorpo na superfície da membrana, que provoca alterações mínimas da densidade local de carga superficial e, portanto, da diferença de potencial entre superfície sensora e eletrólito. Este potencial pode ser detectada por dispositivos sensores de pH (24), devido à alta sensibilidade dos mesmos, dentro de condições específicas, como a utilização de transistores de efeito de campo (FETs), em especial o FET metal óxido semicondutor (MOSFET) cuja porta foi substituída por um eletrodo de referência em contato com um eletrólito, chamado FET de porta estendida e separada (SEGFET) e amplificadores de instrumentação (AI).

É possível medir concentrações bem reduzidas, da ordem de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e até ng.mL^{-1} , o que é interessante do ponto de vista científico, pois é possível detectar as concentrações da proteína de interesse no limite inferior em que podem ser encontradas no organismo. No entanto, a proteína NS1 é comumente encontrada em concentrações relativamente altas (14, 25), ou seja, bem acima do limite experimental, e como é mais importante o diagnóstico do ponto de vista clínico, não há necessidade do conhecimento exato da concentração, mas sim da presença da proteína.

Visando contribuir para o desenvolvimento de plataformas integradas de diagnóstico rápido da dengue, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um dispositivo imunossensor capaz de detectar a proteína NS1 do vírus da dengue. A ideia central é utilizarmos FETs ou amplificadores de instrumentação como transdutores de sinal para a detecção específica de NS1. Deste modo, este trabalho foi baseado na construção imunossensores através da utilização de plataformas sensíveis à variações de pH (18-20). Anticorpos foram immobilizados em substratos devidamente funcionalizados através de técnicas de automontagem (26). Acreditamos que a eficácia de imunossensores potenciométricos aliada à alta afinidade da ligação antígeno-anticorpo seja promissor para a confecção de um biossensor imunológico capaz de conferir um diagnóstico rápido e preciso da dengue de maneira eficiente e de baixo custo. A proposta ou objetivo da tese bem como sua organização é descrita a seguir.

1.1 Objetivos

Os principais objetivos desta dissertação são:

- I. **Construção de um imunossensor:** construir uma plataforma capaz de detectar a interação antígeno-anticorpo de forma direta e rápida e que permita a aquisição e tratamento dos dados através de um computador, partindo da funcionalização de substrato de vidro recoberto com ouro e subsequente imobilização de anticorpo.
- II. **Caracterização das membranas sensíveis:** utilizar diversas técnicas de microscopia, entre outras, para caracterizar os substratos utilizados e os imunossensores obtidos, garantindo a presença do anticorpo na plataforma.
- III. **Desenvolvimento de imunossensores para detecção de proteína NS1 do vírus da Dengue:** aplicar os imunossensores na detecção precoce, ou seja, entre os primeiros dias de infecção da Dengue, uma doença negligenciada que atinge milhões de pessoas todos os anos através da medida no potencial de circuito aberto (OCP) utilizando um MOSFET aplicado como SEGFET e um AI.
- IV. **Otimização e miniaturização do sistema:** partindo do imunossensor devidamente caracterizado, é de interesse não apenas científico como também comercial que a plataforma proposta possa agir em sistemas reais, para isso, procurou-se a miniaturização do sistema e seu desenvolvimento na forma de uma plataforma portátil e de baixo custo.

O imunossensor desenvolvido baseia-se na capacidade de MOSFETs utilizados como transdutores em sensores de pH (27), ou seja, estes são dispositivos capazes de perceber a alteração iônica na superfície do sensor com grande precisão, sendo possível detectar íons não apenas quando eles são produzidos através da catálise enzimática (18) mas também através da alteração de carga local devido a interações do tipo antígeno-anticorpo (28).

Visando este tipo de aplicação, escolheu-se como alvo a dengue, uma doença que carece de métodos diagnósticos que detectam precocemente a infecção viral nos primeiros dias de infecção, através do uso da proteína NS1. A NS1 é muito eficiente como marcadora da doença devido a sua presença em grandes concentrações no sangue de pacientes infectados.

Num primeiro momento visou-se a construção de uma membrana sensível com anticorpos anti-Dengue (imunoglobulinas IgG e IgY) imobilizados capazes de interagir com a proteína de interesse.

Tendo construído a plataforma com sucesso, partiu-se para os procedimentos de caracterização, com o objetivo de assegurar a presença do anticorpo no substrato e sua homogeneidade e facilidade de reprodução.

Desde o início do projeto, contamos com a colaboração da empresa DNAPta de São José do Rio Preto, que atuou fornecendo parte do material necessário. O sucesso no desenvolvimento do imunossensor levou ao interesse conjunto na produção de uma patente da plataforma, que acabou por incentivar a continuidade da pesquisa não apenas no sentido de aperfeiçoamento do imunossensor produzido como de sua miniaturização e consequente fabricação de um dispositivo portátil e de baixo custo.

Com este objetivo em mente, iniciou-se o processo de miniaturização do sistema de medida, ponto em que foi introduzido o amplificador de instrumentação (AI) como alternativa ao MOSFET, devido a sua maior simplicidade na operação, por não haver necessidade de fonte variável de tensão e o baixo custo instrumental. As pesquisas neste sentido continuam e já foi realizado o pedido de depósito da patente, em tramitação sob o Processo USP nº 13.1.163.76.1 em providências pela Agência USP de Inovação, visando o depósito junto ao INPI de Pedido e Patente.

1.2 Organização da dissertação

A dissertação está estruturada da seguinte maneira: o Capítulo 2 introduz e situa a Dengue como uma doença negligenciada de extrema importância no cenário mundial devido ao grande número de infecções anual e a contínua deficiência dos métodos de diagnóstico precoce. O Capítulo 3 intera teoricamente o leitor sobre os dispositivos utilizados como transdutor de sinal, o MOSFET CD4007UB e o AI INA111, além de proporcionar uma visão geral sobre imunossensores potenciométricos. O Capítulo 4 descreve os materiais e métodos utilizados na confecção das plataformas e sua configuração experimental. O Capítulo 5 discorre sobre os resultados obtidos, desde a caracterização até o início do processo de

miniaturização da plataforma. O Capítulo 6 encerra esta dissertação com as conclusões do trabalho e suas perspectivas futuras.

2 PARTICULARIDADES SOBRE A DENGUE

Neste capítulo será introduzida a dengue, onde serão abordados sua condição como doença negligenciada, aspectos de diagnóstico clínico e laboratorial, com especial atenção para os casos mais graves da doença e finalmente o alvo escolhido para aplicação em imunossensores e sua importância.

2.1 Histórico: a dengue no Brasil e no mundo

A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus do gênero *Flavivírus*, pertencente à família *Flaviviridae*, transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. O vírus apresenta quatro sorotipos designados com o mesmo nome (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), cuja severidade da infecção é influenciada pela idade e antecedentes genéticos do paciente, a linhagem e o sorotipo do vírus infectante e o histórico de prévias infecções por dengue do paciente (29). Segundo a WHO , cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo sofre com as doenças negligenciadas, sendo que 3.5 bilhões, ou seja, metade da população mundial, vivem em áreas onde o vetor da dengue, o *Aedes aegypti*, pode ser encontrado (1-2).

A enfermidade afeta a população compreendida nas áreas tropicais e subtropicais, representando cerca de 100 países, como mostra a Figura 2.1. Cerca de 50 milhões de infecções ocorrem a cada ano, e a incidência vem aumentando significativamente principalmente nas Américas nas últimas décadas (1). Desse total, cerca de 550 mil precisam de hospitalização, e aproximadamente 20 mil vêm a óbito (1).

Estima-se que os primeiros casos no continente americano ocorreram no século XVII, embora não haja consenso sobre sua origem geográfica. Algumas teorias apontam a África e outras a Ásia como ponto de partida (29-30). Entretanto, independente da origem, é conhecido que o vírus foi difundido para a América através do comércio marítimo de escravos através do Atlântico (29-30). Desde então houve pandemias, começando no século XVIII e chegando até o presente. Os primeiros vírus da dengue foram isolados somente em 1940 durante a Segunda Guerra Mundial, e apenas em 1956 foram conhecidos todos os sorotipos, os quais prevalecem até hoje (30).

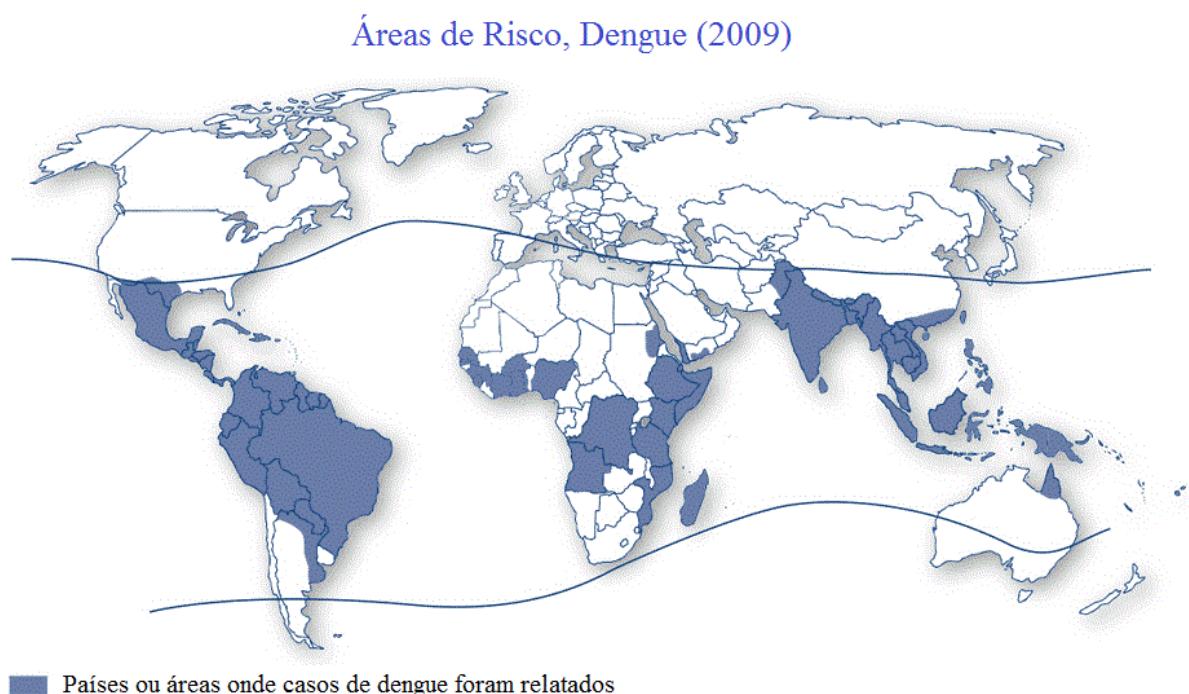


Figura 2.1 – Distribuição mundial das áreas de risco de infecção para o ano de 2009. As linhas definem os limites de sobrevivência do mosquito *Aedes aegypti* durante o ano, representando áreas onde a transmissão do vírus da dengue é possível (1).

O caso mais severo da dengue, conhecido como dengue hemorrágica (DHF, do inglês, *dengue hemorrhagic fever*), não é um acontecimento recente. Casos vêm sendo relatados esporadicamente desde 1780, mas devido a sua raridade, não eram considerados um problema de saúde pública. Este quadro mudou a partir da segunda metade do século XX, como consequência das perturbações ecológicas no sudeste da Ásia durante e após a Segunda Guerra Mundial, que tornaram ideais as condições para proliferação de doenças transmitidas por mosquitos de modo geral (30). Esse aumento abrupto na transmissão permitiu a cocirculação na mesma região de múltiplos sorotipos, causando uma epidemia de DHF, sendo que na década de 70 já tinha se tornado a maior causa de hospitalização e morte das crianças na região (30). Isso se deve ao fato do doente ficar imunizado apenas contra o sorotípo contraído, o que não garante a proteção quanto aos outros sorotipos. Em outras palavras, uma pessoa está sucessível a contrair dengue até quatro vezes (2).

Até os dias de hoje, dengue e DHF são considerados problemas de saúde pública. O crescimento populacional acelerado, seguido da urbanização descontrolada e sem planejamento, caracterizada por condições de moradia abaixo do padrão, uso de água não potável e seu acúmulo ao ar livre, além da falta de medidas eficazes de contenção do mosquito transmissor faz com que o problema esteja ainda fora de controle, sendo que dentre

os países da América Latina, o Brasil é o país que mais sofre com a doença, estando ela presente em todos os estados (2, 30-31).

No Brasil já ocorreram quatro ondas epidêmicas: a primeira em 1986/1987 e a segunda em 1990/1991, principalmente no estado do Rio de Janeiro e região nordeste; a terceira em 1998 contando com 570 mil casos e a quarta em 2010 com quase 1 milhão de casos (1-2). A Figura 2.2 mostra a distribuição nacional das áreas de risco de infecção no período compreendido entre 2000 e 2008.

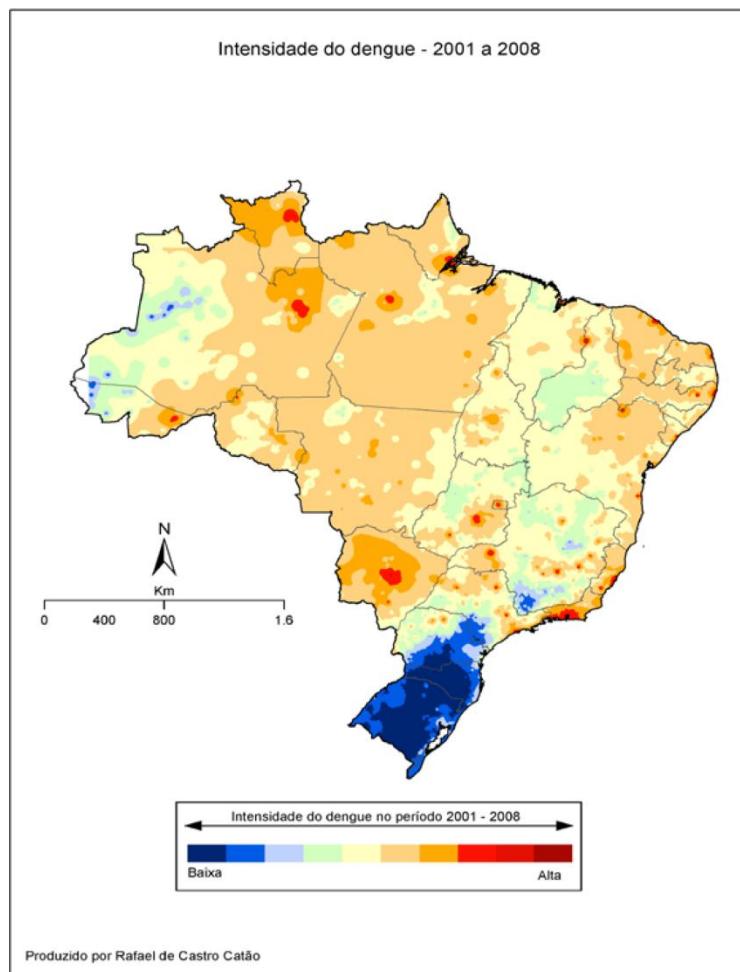


Figura 2.2 – Distribuição nacional das áreas de risco de infecção para o período entre 2001 à 2008 (31).

Devido à magnitude do problema, o país possui uma série de diretrizes formuladas pelo Ministério da Saúde, no sentido de preparar os profissionais, principalmente na rede pública, a classificar e manejar corretamente o paciente com suspeita de dengue, organizadas no documento *Diretrizes Nacionais para Prevenção e controle de Epidemias de Dengue*:

As intervenções sobre o problema são, em alguns aspectos, reconhecidas como de difícil implantação, por seu caráter de atuação global, que transcende o setor saúde. Algumas outras ações, entretanto, são de responsabilidade imediata dos gestores de saúde locais e potencialmente capazes de produzir mudanças efetivas no quadro atual, com destaque para a redução da letalidade dos casos de dengue com complicações e de febre hemorrágica da dengue (8).

Observa-se na Figura 2.3 os dados relativos à dengue no país, retirados do site do Ministério da Saúde (2), onde fica claro que nos últimos anos a média de casos tem sido elevada, em torno de 600 mil, com um número de mortes resultante de dengue hemorrágica e sua evolução em DSS também muito alto se comparado com o período até 2005, revelando claramente a necessidade do desenvolvimento de métodos eficientes de diagnóstico logo no início da manifestação da doença, principalmente no sentido de evitar a ocorrência de casos mais graves.

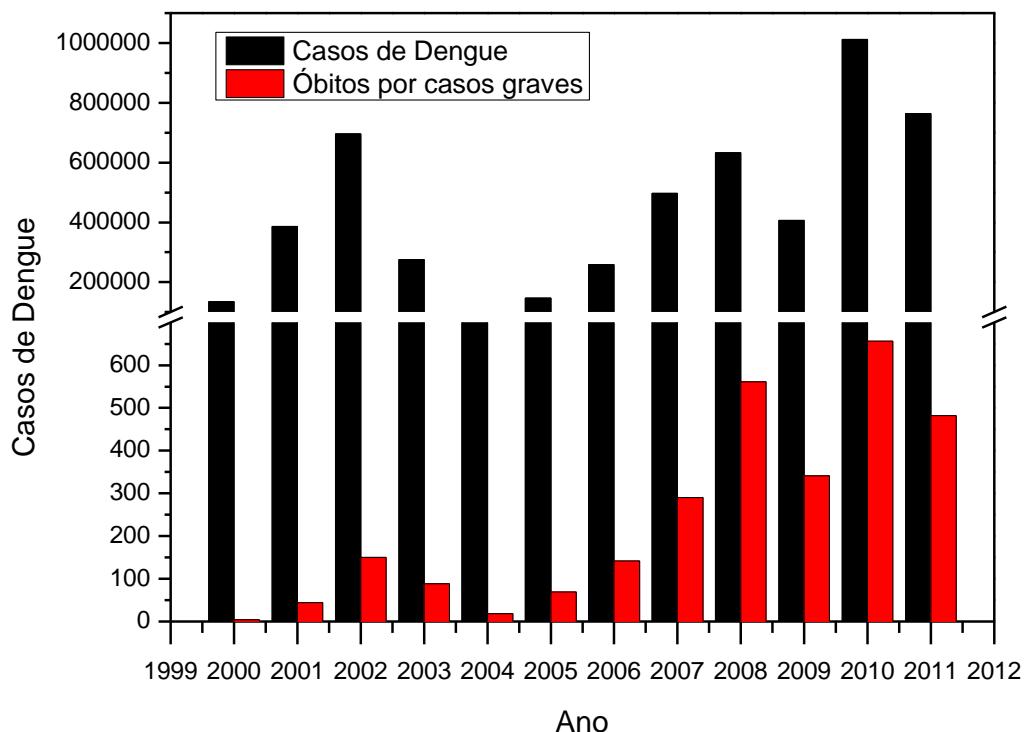


Figura 2.3 – Dados relativos aos casos de dengue (preto) e aos óbitos devido a casos graves (DHF e DSS) (vermelho) no período de 2000 à 2011 no Brasil (2).

2.2 Caracterização da doença

Os diferentes sorotipos do vírus da dengue são transmitidos pelos mosquitos do gênero *Aedes*, dentre os quais se destacam as fêmeas da espécie *Aedes aegypti* (os machos se alimentam apenas de frutas e néctar de flores), apresentada na Figura 2.4, que se alimentam de sangue como parte fundamental do ciclo de desenvolvimento e maturação dos ovócitos, podendo picar várias pessoas no mesmo dia (1-2). A fêmea deposita seus ovos em lugares úmidos, na superfície de recipientes, e estes podem sobreviver até 450 dias sem água (2).



Figura 2.4 – Fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (32).

A pessoa que foi picada passa por um período de incubação do vírus que varia entre 3 e 7 dias. Infecções primárias, ou seja, no primeiro contato do organismo com o patógeno, podem não apresentar manifestações claras ou apenas uma febre indiferenciada. Quando há o desenvolvimento da dengue, a infecção se inicia abruptamente com um período febril, com duração de 2 a 3 dias, seguido de alguns sintomas não específicos como cefaleia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema e prurido cutâneo. É importante observar que estes sintomas podem variar de acordo com a idade do paciente, sendo mais comum entre crianças a presença de dor abdominal e entre adultos há ocorrência de manifestações hemorrágicas (1-2, 33-34).

Após o período febril inicia-se a fase crítica, onde ocorrem distúrbios circulatórios de gravidade variada, comumente há o declínio da contagem de plaquetas e o aumento do nível de hemácias. É nesta fase que podem surgir sintomas mais graves, característicos da DHF, que serão tratados mais adiante. Depois de cerca de uma semana o paciente começa a melhorar, através da estabilização da contagem das células do sangue (1, 33). A Figura 2.5

exemplifica detalhadamente o ciclo de infecção pelo vírus da dengue (DV, do inglês *dengue virus*).

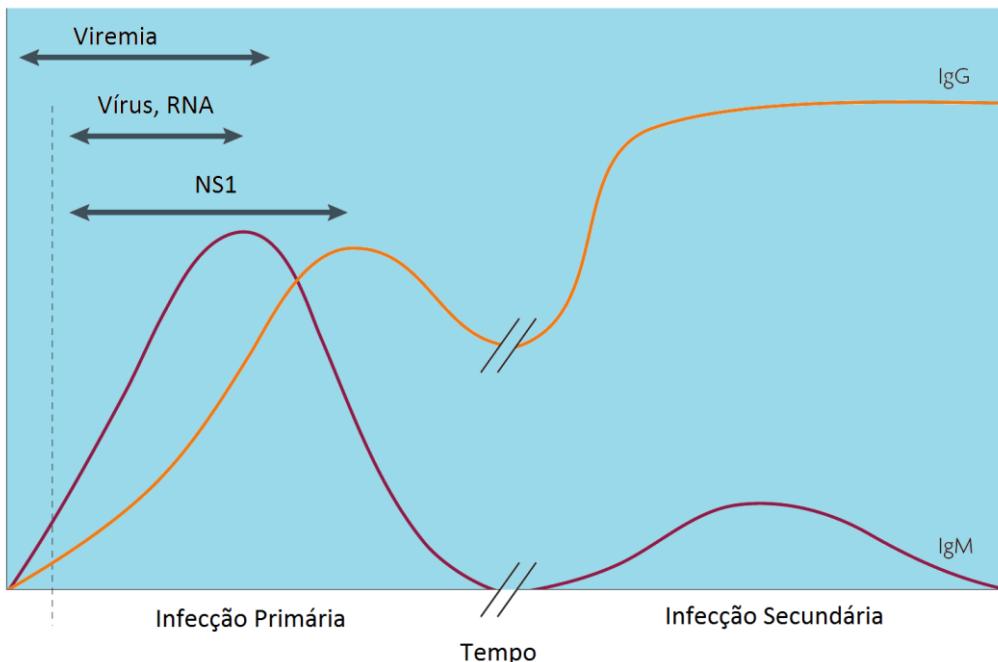


Figura 2.5 – Ciclo de infecção pelo DV. O vírus pode ser encontrado no organismo principalmente no período febril (viremia), juntamente com seu material genético (RNA) e o antígeno característico, a proteína NS1, este se estendendo até o final da fase crítica. A produção de anticorpos (IgM e IgG) se inicia na fase crítica e atinge o pico na fase de recuperação, permanecendo em níveis reduzidos no organismo até o caso de uma infecção secundária, quando seus níveis aumentam rapidamente para combater a doença (34).

No caso particular de DHF, inicialmente os sintomas são os mesmos de uma infecção por uma dengue comum ou clássica (DF, do inglês *dengue fever*), há uma complicação do quadro a partir do terceiro dia de infecção. Casos de DHF são caracterizados basicamente por quatro sintomas: febre alta ($> 39^{\circ}\text{C}$), podendo durar até 7 dias, hemorragia em diversos órgãos (gastrintestinal, intracraniana, entre outras), trombocitopenia ($\leq 10^5 \text{ células.mm}^{-3}$) e colapso circulatório. O maior diferencial entre DF e DHF é a ocorrência de extravasamento de plasma, devido a índices muito elevados de hematócitos, ou seja, percentagem elevada de glóbulos vermelhos ou hemácias no sangue, geralmente 20% maior que o valor basal, podendo chegar a níveis até 54% maiores (1, 30, 33).

Há ainda um agravante neste quadro, que são pacientes que progridem para um estado de choque, ou seja, crise aguda de insuficiência cardiovascular onde há dificuldade de irrigação dos tecidos do corpo com oxigênio. O estado de choque proveniente de DSS é o chamado choque hipovolêmico, derivado de hemorragias graves e desidratação, onde a perda de sangue leva à um estado perigoso de baixa pressão arterial ($< 20 \text{ mmHg}$). As chances de óbito neste estado são elevadas se o paciente não tiver acesso a tratamento imediato, levando

à morte em um curto período de 12 a 24 horas (1, 30, 33). A Figura 2.6 apresenta os tipos de manifestação possíveis de infecção.

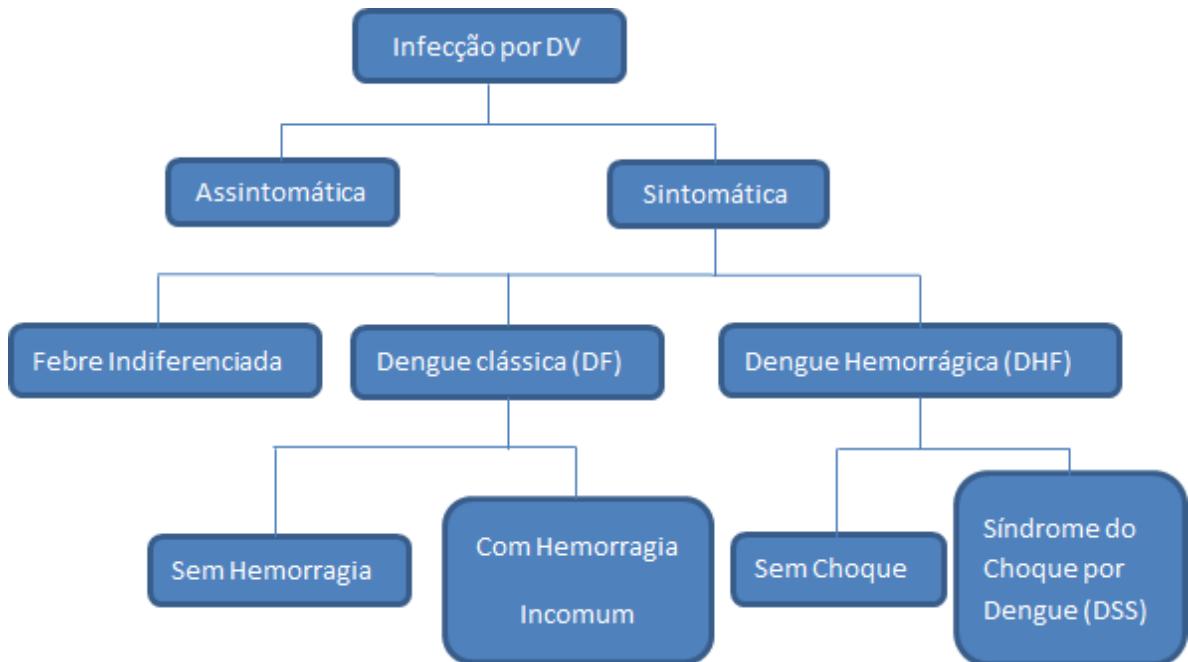


Figura 2.6 – Tipos de manifestações da infecção por vírus da dengue (1).

Estudos mostram que a probabilidade de ocorrência de DHF é maior em infecções secundárias comparativamente à infecções primárias, por um fator de 10 vezes ou mais, reforçando a importância do monitoramento dos sorotipos virais em circulação e das medidas de prevenção (33). Embora as razões ainda não sejam inteiramente compreendidas, sabe-se que os anticorpos resultantes de uma infecção primária por determinado sorotipo ao invés de atuarem durante a infecção secundária como uma forma de proteção, o efeito produzido é o oposto, promovendo um aumento na captação do vírus (33). Mais especificamente, o anticorpo facilita a fagocitose do vírus pelos macrófagos, e sendo um anticorpo produzido por um sorotipo diferente, ao invés de neutralizar o vírus ele então está livre para se replicar dentro das células de defesa, auxiliando portanto a replicação viral (30, 33). A infecção dessas células inicia a resposta imunológica relacionada com mediadores vasoativos e produção de citotoxinas, levando aos sintomas já citados anteriormente (30).

2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico definitivo para dengue não pode ser dado apenas através da observação clínica, há necessidade de confirmação laboratorial devido à variabilidade nos sintomas associados à DF e também à generalidade de alguns deles. De toda forma, mesmo que o caso seja apenas suspeito, e não um caso confirmado, a WHO recomenda que sejam reportados (1, 30).

Para casos de dengue clássica, são considerados como prováveis aqueles em que o paciente apresenta febre e dois ou mais dos sintomas apresentados na Sessão 2.2. Para os casos mais graves, o diagnóstico de DHF exige a presença de todos os sintomas apresentados (1, 33) e sua evolução em DSS necessita ainda de pressão baixa (< 20 mmHg), pele fria, pegajosa e agitação (1). A confirmação vem através da junção entre os sintomas e algum dos possíveis exames laboratoriais, como, por exemplo, o isolamento do vírus no sangue, demonstração de alterações nos níveis de anticorpo (IgG e IgM) e presença de抗ígenos; presença de DV através de um exame de imunofluorescência (ELISA) ou ainda através de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) (1, 30).

O vírus ou amostras de seu RNA podem ser obtidas dentro dos 5 primeiros dias de infecção, por isso é procedimento de rotina coletar uma amostra de sangue o mais rápido possível após o início da doença e outra depois de decorrido o período de 2 – 3 semanas. Essa segunda amostra é interessante para os exames de análise sorológica que identifica as imunoglobulinas, já que as IgG produzidas persistem por toda a vida, sendo feita uma comparação com a concentração na época da doença para provar uma alteração brusca na concentração, comprovando que houve contaminação. Embora seja um dos testes mais acessíveis, as chances de reação cruzada devido a infecção por outro flavivírus não pode ser descartada, implicando em uma especificidade não muito alta (1, 35).

O teste ELISA utiliza anticorpos específicos ao antígeno de interesse, sobre o qual geralmente se liga outro anticorpo, este marcado com uma enzima, cujo substrato de reação é posteriormente adicionado, produzindo um sinal geralmente associado com a alteração de coloração da solução (36). Este teste apresenta algumas desvantagens, como o custo moderado e ocorrência de falsos-positivos, além da medida ser realizada de modo indireto.

Por outro lado, temos os testes de isolamento viral e detecção de RNA que são altamente específicos (37-38), chegando a obter 100% de resultados positivos sem nenhuma interferência por reatividade cruzada. Isto se deve à capacidade da enzima transcriptase

reversa de sintetizar DNA complementar (cDNA) a partir de amostras de RNA, seguida da reação de PCR, a partir da utilização dos primers desenhados de acordo com a região que se deseja produzir em larga escala. As alíquotas obtidas podem ser examinadas após a reação através de espectroscopia UV-Vis, sendo que onde a reação ocorreu haverá uma absorbância elevada, enquanto que o mesmo não ocorre para os casos em que a sequência de RNA não corresponde ao material genético do vírus da dengue (39). Contudo, a estrutura laboratorial necessária para a realização desse tipo de exame não é corriqueira, há necessidade de equipamentos e reagentes (primers, kit para realização de RT-PCR, entre outros) elevando bastante o custo para sua realização e excluindo a possibilidade de serem encontrados no sistema público de saúde. Dessa forma, esse recurso é utilizado apenas para estudos epidemiológicos e no desenvolvimento de vacinas (40-41).

O teste que representa o equilíbrio entre especificidade e custo é o de detecção de antígenos NS1 (13, 42), sendo este o foco desta dissertação. Sua identificação se encontra como o teste mais indicado para o diagnóstico laboratorial da dengue (15). A importância desta proteína na detecção de vírus da dengue será apresentada na próxima sessão.

2.4 O vírus da dengue e a proteína NS1

O vírus da dengue é um vírus de ácido ribonucleico fita simples (ssRNA) de sentido positivo^{*} com cerca de 11 kb, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que incluem os vírus causadores da febre do oeste do Nilo, febre amarela, hepatite C e encefalite (43). O DV codifica três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) envolvidas na replicação do vírus. A Figura 2.7 mostra a morfologia do vírus e sua estrutura cristalográfica obtida por crio-microscopia de raios-X a uma resolução de 3.5 Å, retirada do PDB (*Protein Data Bank*) (44). O vírus possui um diâmetro de 50 ~ 60 nm, com um envoltório glicoproteico que consiste nas proteínas de envelope (E) e membrana (prM), sendo seu interior constituído apenas do material genético e a proteína de capsídeo (C).

Quando infecta uma célula saudável, o genoma viral é transcrito em uma poliproteína, que é então direcionada ao retículo endoplasmático (RE), onde é processada por proteases

^{*} Sentido positivo significa dizer que o RNA viral se assemelha ao RNA mensageiro (mRNA), ou seja, pode ser traduzido diretamente pela célula infectada.

provenientes do vírus e da própria célula infectada. Ao atingir a conformação ativa, as proteínas NS iniciam a replicação do genoma viral. Apesar do processo de replicação viral ser entendido de maneira geral, falta ainda informação estrutural e funcional com relação as proteínas NS, principalmente a NS1, NS2A e NS4A/B (45-46).

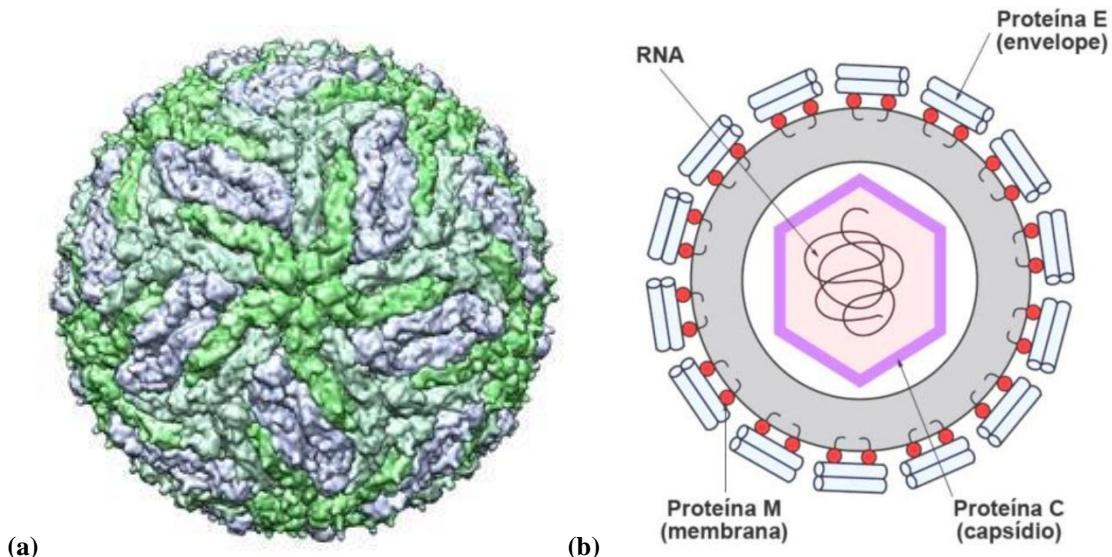


Figura 2.7 – (a) Estrutura cristalográfica do vírus da Dengue (3J27) (47) e (b) sua morfologia (48).

A proteína NS1 é um marcador interessante da dengue pois é encontrada em grandes concentrações no sangue de pacientes infectados, podendo inclusive ser um marcador diferencial entre DF e DHF (14). Ela é uma glicoproteína de aproximadamente 45 kDa com dois sítios de glicosilação N-ligados que pode ser encontrada em diversas formas (monômero, dímero e hexâmero). Logo no RE os monômeros de NS1 são glicosilados e assumem rapidamente a forma dimérica. Os carboidratos ligados ao dímero sofrem algumas modificações no complexo de Golgi, antes de serem transportados para fora da célula. Esta forma extracelular é encontrada na forma de hexâmeros (49-50). A glicosilação e suas modificações são essenciais para que a proteína seja liberada de forma solúvel para fora da célula (50).

As concentrações no início da infecção para pacientes primários e secundários varia entre 10 ng.mL^{-1} a $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e pode chegar até cerca de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (14, 25). Como a concentração atingida no sangue pode ser considerada alta, este torna-se um alvo relativamente fácil de se detectar, ainda mais se considerado o ponto de vista clínico, onde o interesse reside no diagnóstico baseado na presença ou ausência da proteína, caso em que a concentração perde a relevância, embora a sensibilidade das plataformas encontradas na literatura apresentem um queda significativa ao se tratar de infecções secundárias, de modo

que a busca por dispositivos com um limite de detecção menor é de grande interesse (13, 51), ainda mais levando-se em consideração a chance de incidência de DHF nestes casos. Sua detecção é comum na forma do teste ELISA ou na forma de imunossensores, sendo esta última o foco do próximo capítulo.

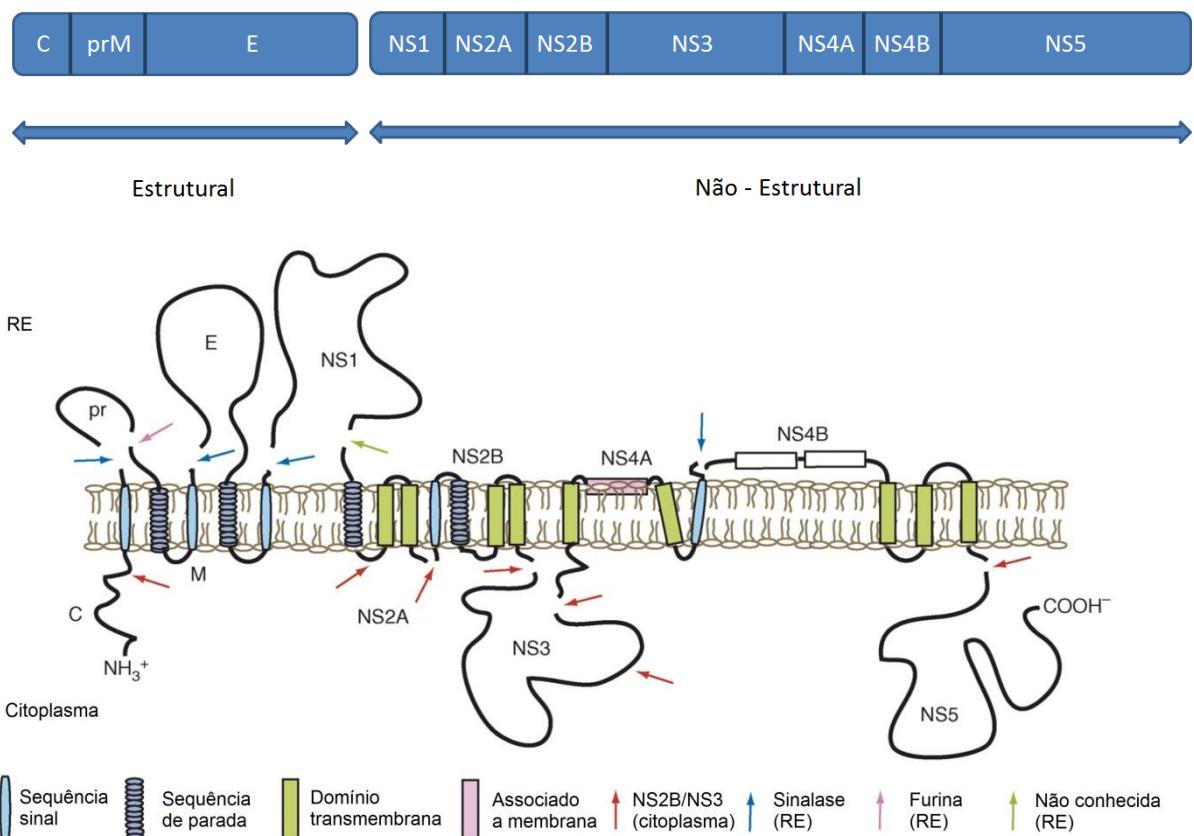


Figura 2.8 – Representação do genoma do vírus e da poliproteína (45).

3 IMUNOSENSORES POTENCIOMÉTRICOS

Um biosensor é um dispositivo compacto que fornece informação analítica através de um elemento biológico acoplado a um transdutor. O elemento biológico reconhece um determinado analito através de uma interação ou reação biológica convertendo-a em um tipo de sinal mensurável (52-53). Biosensores podem incorporar diversos tipos de agentes biológicos, por exemplo: enzimas (18), receptores celulares (54), ácidos nucléicos (55), microrganismos (56) e anticorpos (57). Nesse último caso, dá-se o nome de imunossensor, ou seja, detectam-se especificamente interações do tipo antígeno-anticorpo (Ab-Ag).

Existem diversos métodos através dos quais é possível monitorar o sinal resultante das interações antígeno-anticorpo e obtê-los na forma de dados que possam ser tratados posteriormente. Independente do transdutor, um imunossensor tem uma estrutura básica, representada na Figura 3.1. O sinal é gerado através da interação entre o antígeno presente na amostra de interesse e o anticorpo immobilizado. Esse sinal é processado pelo transdutor, que pode ser eletroquímico (potenciométrico, amperométrico, capacitivo, impedância) (58-61), ótico (fluorescência, luminescência, índice de refração) (62-64), piezoelettrico (65-66), entre outros.

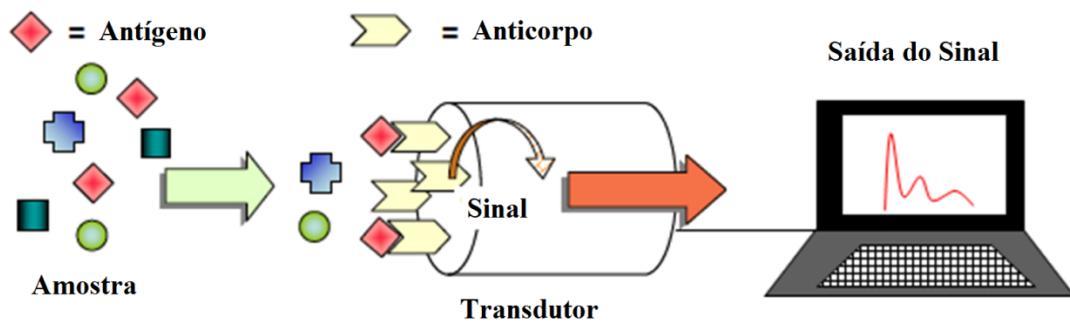


Figura 3.1 – Representação de um imunossensor padrão. O antígeno presente na amostra de interesse interage com o anticorpo immobilizado no transdutor, gerando um sinal que pode ser visualizado digitalmente (57).

As técnicas eletroquímicas estão entre as mais utilizadas (67), devido a sua compatibilidade com tecnologias de miniaturização e microfabricação, com baixo custo, e a possibilidade de detecção sem utilização de marcadores. O sinal eletroquímico obtido possibilita relacionar quantitativamente o analito presente na solução (17).

Dentre as possibilidades de detecção eletroquímicas, o foco deste trabalho são os imunossensores potenciométricos. Estes dispositivos se baseiam na alteração de potencial entre um eletrodo de referência e um eletrodo onde ocorre a interação. Neste caso, o elemento biosseletivo reconhece o analito de interesse e se liga a ele gerando uma alteração na distribuição local de carga e o elemento transdutor possibilita o controle deste processo realizando a conversão do sinal bioquímico em sinal mensurável, geralmente elétrico (24).

Este processo se assemelha a um sensor de pH, que detecta cargas (íons) em uma solução a partir de um eletrodo sensível às cargas. Um dos dispositivos mais utilizados e eficientes utilizados como sensor de pH são os transistores de efeito de campo sensível a íons seletivo (*Ion-sensitivity field-effect transistors - ISFETs*), cuja ideia de utilização como imunossensor surgiu pela primeira vez em 1988 com Bergveld (68), que prosseguiu seus estudos na área verificando teoricamente as situações em que é possível detectar interações do tipo Ab-Ag com ISFETs (28), cujo modo de funcionamento será detalhado na seção 3.2.

Além disso, uma alternativa ao uso de FETs são os amplificadores de instrumentação (AI), que funcionam com um modo de leitura do tipo potencial de circuito aberto (*Open Circuit Potential – OCP*), que será discutida em detalhes na seção 3.3.

A detecção em imunossensores pode ser feita de maneira indireta, quando o sinal é obtido através de um marcador, por exemplo uma enzima, sendo a peroxidase uma das mais utilizadas, através da monitoração da sua reação de oxidorredução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (69), ou o uso de uma molécula fluorescente (70); ou de maneira direta, quando o sinal obtido provém apenas da interação Ab-Ag (71). A terceira opção apresenta uma relevância maior, já que o uso de marcadores de qualquer tipo encarece o dispositivo e envolve maior complexidade no uso, sendo a forma de detecção escolhida neste trabalho.

3.1 Elemento ativo do imunossensor: Anticorpos

Anticorpos são uma família de glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig), divididas em cinco classes: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. Entre elas, a IgG é a mais abundante no organismo, correspondendo a uma fração de 70% dos anticorpos. A IgG é uma molécula em forma de Y constituída por duas cadeias polipeptídicas ligadas entre si por ligações dissulfeto (Figura 3.2). São duas cadeias idênticas chamadas pesadas (~50 kDa cada) e duas cadeias idênticas chamadas leves (~25 kDa cada) totalizando cerca de 150 kDa. Estas cadeias possuem um domínio constante (C) e um domínio variável (V), devido a correspondente variabilidade da sequência de aminoácidos, sendo acrescentado o subíndice V_L e C_L indicando os domínios correspondentes da cadeia leve e V_H e C_H (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} neste caso) para o pesado. É comum ainda a denominação pelo fragmento de ligação ao antígeno (F(ab')₂) e o fragmento de base do anticorpo ou fragmento adicional (Fc) (17, 72).

O mais importante para a interação antígeno-anticorpo (Ag-Ab) são as regiões variáveis. A especificidade da ligação do antígeno ao epítopo depende da sequência de aminoácidos dessa região, e é justamente graças a supervariabilidade dela que a interação possui uma afinidade tão elevada. Define-se a constante de afinidade (K) entre o antígeno e o anticorpo pela seguinte equação de equilíbrio:



$$K = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]} \quad (3.2)$$

Os valores de K variam entre 10⁶ e 10¹² L.mol⁻¹, o que faz dos anticorpos moléculas muito interessantes para aplicação em sensores, devido a sua alta afinidade e seletividade, característica da interação Ag-Ab.

É interessante citar os anticorpos produzidos por aves, em especial nas galinhas (*Gallus domesticus*) devido a facilidade de obtenção de proteínas recombinantes provenientes de gema de ovo. A imunoglobulina IgY é o anticorpo produzido em maior quantidade em aves, assim como a IgG nos mamíferos. Ela é secretada no sangue e transferida para a gema do ovo, funcionando como uma proteção eficiente contra doenças

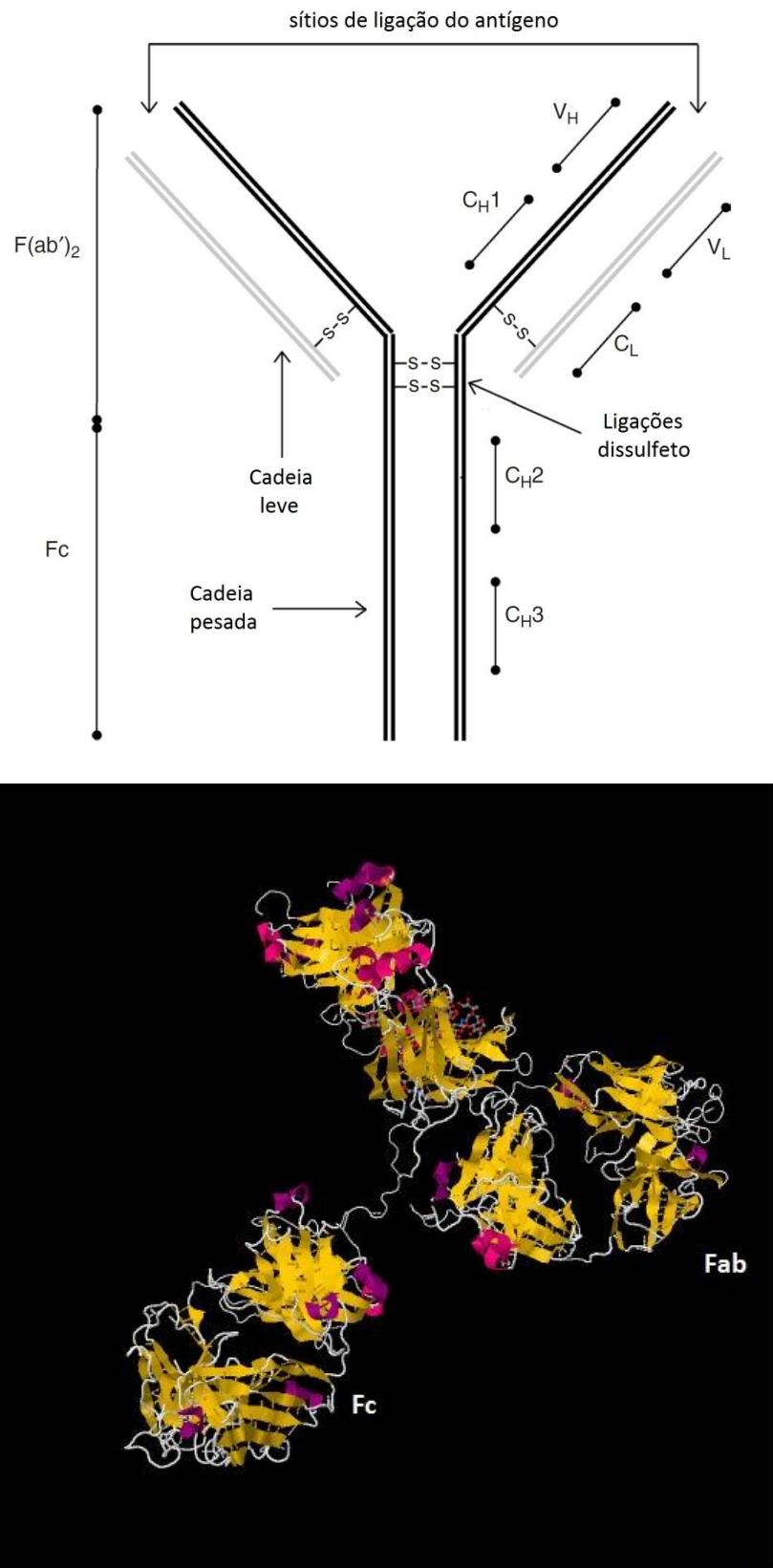


Figura 3.2 – (a) Representação de um anticorpo IgG, mostrando a região de ligação do antígeno (entre as cadeias leve e pesada) denominada $F(ab') e a região de base do anticorpo Fc (17). (b) Estrutura cristalográfica de uma IgG humana, 1HZH (44).$

comuns em aves até que o sistema imunológico do embrião esteja totalmente desenvolvido (73-74), sendo essencial nos primeiros dias depois que o ovo racha.

Estruturalmente, a IgY é constituída da mesma maneira que a IgG, ou seja, de cadeias leves e pesadas com domínios variáveis e constantes, porém apresenta mais um domínio pesado de modo que seu peso molecular é maior, entre 167 – 250 kDa (73). Sua concentração é cerca de $5 - 7 \text{ mg.mL}^{-1}$ no sangue e chega até $100 \text{ mg.gema de ovo}^{-1}$ na gema. Devido a esta concentração elevada na gema de ovo, ela é altamente indicada para purificação de anticorpos policlonais (pAb). Além disso, ovos podem ser obtidos diariamente por uma mesma galinha imunizada, sendo que cada ovo pode fornecer 100 mg de IgY purificada (75), representando um rendimento bem maior e contínuo do que o obtido por qualquer mamífero.

A distância filogenética entre mamíferos e aves também é um ponto positivo no uso de anticorpos IgY. A distância entre a fonte de抗ígenos e o sistema imune utilizado aumenta a resposta imune e diminui a reatividade cruzada, promovendo um sistema ideal quando se trata de imunossensores (73-74). O reconhecimento de epítópos também é maior se comparado a IgY com a IgG com relação a um mesmo antígeno.

Analogamente a IgG, a IgY também é uma proteína bem estável, podendo ser armazenada a 4°C sem perder a atividade, ou ainda na forma liofilizada em -20°C por muitos meses e à temperatura ambiente até cerca de 37°C por um mês (73).

Neste trabalho serão utilizados anticorpos IgG e IgY, visto que ambos são eficientes em imunoensaios e as vantagens da IgY serão exploradas e discutidas apropriadamente mais a frente.

Os imunossensores são baseados na interação antígeno-anticorpo, possibilitando a construção de dispositivos de fácil operação, miniaturização e digitalização, possuindo extrema importância na área de diagnóstico clínico (12, 17, 76-77). As próximas seções (3.2 e 3.3) farão uma descrição dos dispositivos transdutores utilizados neste trabalho.

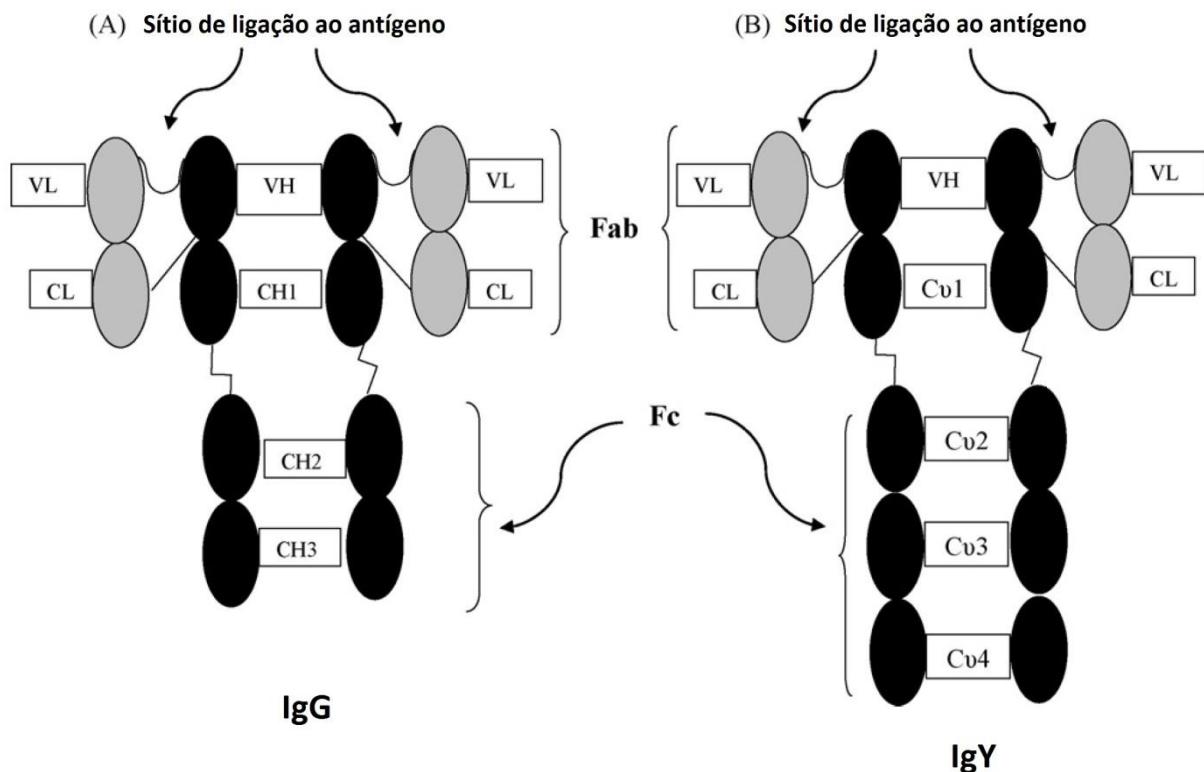


Figura 3.3 – Representação estrutural de uma imunoglobulina (a) IgG comparada com uma (b) IgY. O domínio constante e pesado nos anticorpos de aves é representado por Cv para facilitar a diferenciação entre a nomenclatura de mamíferos e aves (73).

3.2 Transistor de efeito de campo

O transistor de efeito de campo (FET, do inglês *field effect transistor*), em especial o FET metal óxido semicondutor (MOSFET), baseado na interface Si (semicondutor) / SiO₂ (isolante), possui propriedades de chaveamento e controle de corrente que proporcionaram a miniaturização de circuitos eletrônicos, aumentando a capacidade de processamento de informações (78). A corrente nestes dispositivos é controlada por uma pequena voltagem aplicada no eletrodo porta e, portanto, eles devem possuir uma alta impedância (muito maior que MΩ) nesse eletrodo. Esta é a condição básica para a aplicação deste dispositivo transdutor do biosensor, já que pequenas voltagens devem ser medidas, ou seja, a carga e sua distribuição na superfície do biosensor não deve ser alterada pelo MOSFET.

O conceito de seu funcionamento é relativamente simples. O dispositivo consiste de um canal através do qual, elétrons (ou buracos) fluem da fonte (*source*) para o dreno (*drain*), onde a condutividade do canal é modulada através do potencial aplicado na porta

(gate), ou seja, há um controle da densidade de corrente no canal. Para que isso aconteça de maneira eficiente, não deve haver vazamento da corrente na porta, de modo que é necessário um material isolante entre a porta e a fonte, canal e o dreno. No caso dos MOSFETs, utiliza-se um óxido, principalmente o SiO₂, que possui alta qualidade (79). Variações no isolamento da porta levam a diferentes dispositivos, que fogem ao escopo desta dissertação.

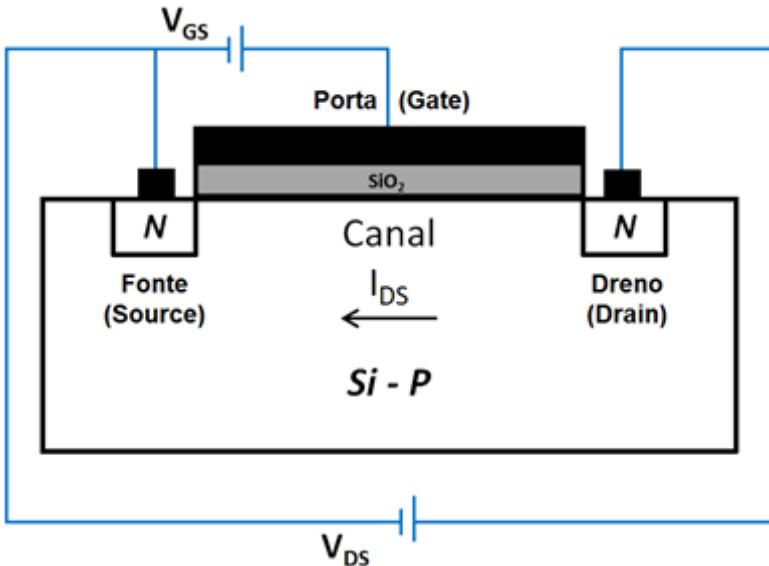


Figura 3.4 – Secção transversal de um dispositivo N-MOS.

MOSFETs podem ser construídos de acordo com os portadores de carga no canal. Quando estes portadores são elétrons, temos um dispositivo n-MOS, quando os portadores são buracos, temos um dispositivo p-MOS. A Figura 3.4 esquematiza um MOSFET de Silício com canal p (p-MOS) e o esquema de polarização do mesmo. A dopagem dos eletrodos fonte e dreno deve ser então de tipo contrário aos portadores de carga no canal, portanto, do tipo n (79).

A região porta-substrato do dispositivo nada mais é que um capacitor, que controla as cargas no substrato. O comportamento das cargas depende portanto da voltagem aplicada na porta (V_{GS}) em conjunto com a voltagem aplicada entre o dreno e a fonte (V_{DS}). Manipulando V_{GS} e V_{DS} observa-se a ocorrência de diversas situações no canal do transistor, representadas na Figura 3.5. Se a tensão na porta for menor que a tensão de faixa plana[†] (V_{FB}) ($V_{GS} < V_{FB}$), mesmo que $V_{DS} > 0$ não há passagem de corrente no canal ($I_{DS} = 0$); quando se aplica $V_{GS} > V_{FB}$ há um acúmulo de cargas negativas na superfície do substrato, conhecido como região de depleção, na qual a corrente ainda é desprezível. Conforme se eleva a tensão V_{GS} atinge-se a

[†] V_{FB} é a voltagem na qual não há carga no semicondutor, logo não há queda de tensão através dele.

tensão de limiar (V_T), ou seja, forma-se uma camada de elétrons livres (cargas de inversão) que possibilitarão o aparecimento da corrente. Define-se a tensão de limiar como se segue:

$$V_T = \frac{\theta_M - \theta_{Si}}{e} - \frac{Q_{SS} + Q_{Ox} + Q_B}{C_{Ox}} + 2\phi_f \quad (3.3)$$

Onde θ_M é a função trabalho do metal, θ_{Si} é a função trabalho do silício, e é a carga elementar, Q_{SS} é o acúmulo de cargas na superfície do silício, Q_{Ox} é o acúmulo de cargas na interface óxido-silício, Q_B é o acúmulo de cargas na região de depleção do silício, C_{Ox} é a capacitância do óxido de porta e ϕ_f é a energia de Fermi no semicondutor tipo p.

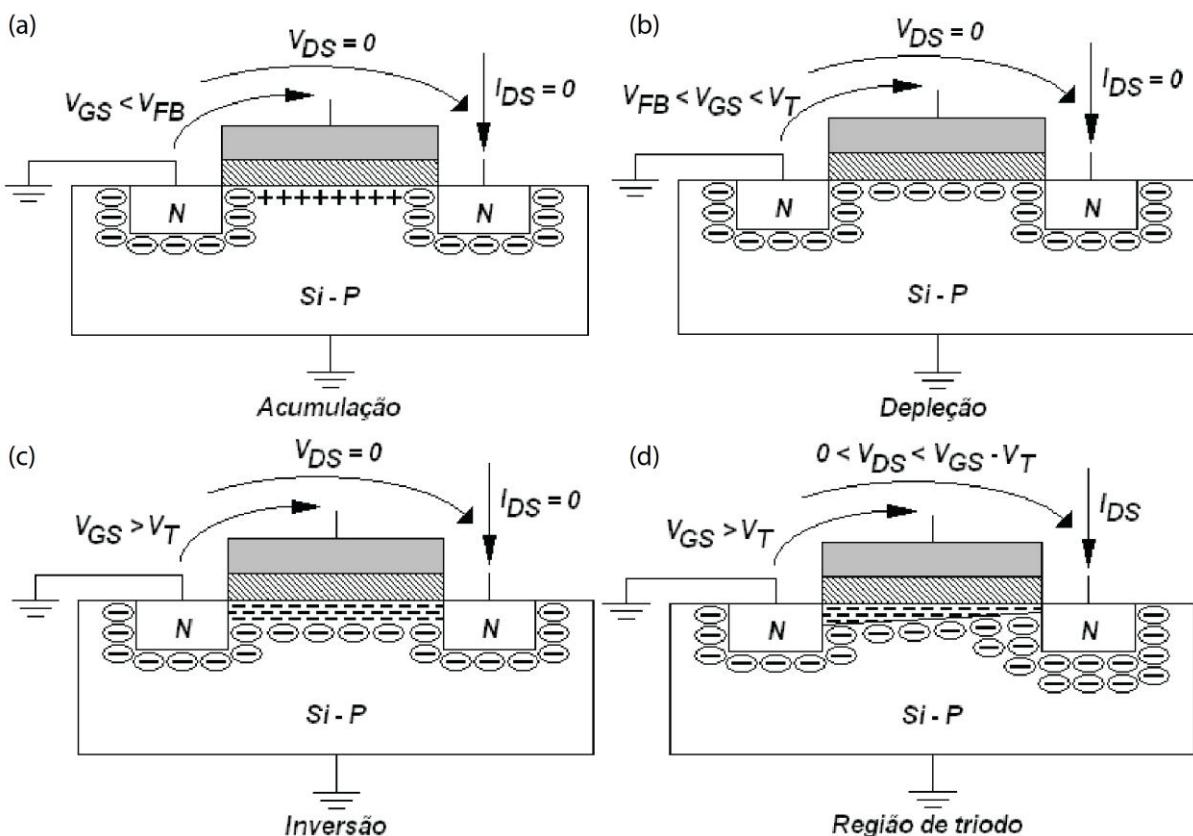


Figura 3.5 – Comportamento do transistor N-MOS nas seguintes situações: (a) acumulação, (b)depleção, (c) inversão e (d) região de triodo (78).

Dentro da possibilidade do aparecimento de corrente, ou seja, $V_{GS} > V_T$, aplica-se um potencial entre o dreno e a fonte, induzindo a passagem de corrente, definida segundo a equação

$$I_{DS} = \mu C_{Ox} \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_T)V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad (3.4)$$

Onde entram parâmetros importantes na construção de um MOSFET que são a largura do canal (W), seu comprimento (L) e a mobilidade dos portadores no canal (μ).

A modulação do valor de V_{DS} é muito importante, pois é através dela que se definem as regiões de trabalho do transistor. Por exemplo, enquanto $V_{DS} < (V_{GS} - V_T)$, diz-se que o transistor está na região de triodo, o que significa dizer que há uma camada de inversão entre a fonte e o dreno. No entanto, pode-se aumentar V_{DS} até o ponto em que ela se iguale a diferença $(V_{GS} - V_T)$, fazendo com que as cargas de inversão próximas ao dreno diminuam, tendendo à zero, ao que se dá o nome de pinçamento da camada de inversão. Essa tensão V_{DS} para este caso específico, onde $V_{DS} = (V_{GS} - V_T)$, recebe o nome de tensão de saturação (V_{SAT}). A corrente nesta condição é definida por:

$$I_{DS} = \mu C_{ox} \frac{W}{L} \frac{(V_{GS} - V_T)^2}{2} \quad (3.5)$$

Para valores acima de V_{SAT} , o ponto de pinçamento se desloca na direção da fonte, sendo o ponto em que o transistor atinge o valor de corrente máxima, e variações para valores maiores de V_{DS} deixam de causar alteração na corrente.

O transistor MOS possui curvas características que podem ser visualizadas na Figura 3.6, de acordo com o que foi explicado anteriormente. São elas a curva da corrente pela tensão dreno-fonte (I_{DS} x V_{DS}), onde se varia a tensão V_{GS} (lembrando que é necessário que $V_{GS} > V_T$ para o aparecimento de corrente) e a curva da corrente pela tensão na porta (I_{DS} x V_{GS}), para pequenos valores de V_{DS} (~200 mV), onde é possível determinar V_T .

Visando a aplicação deste tipo de dispositivo na área de sensores, é interessante introduzir algumas variações do MOSFET tradicional, como o ISFET e o SEGFET (do inglês, *Separative extended gate field effect transistor*). Estas duas novas terminologias promovem algumas alterações nas equações características do MOSFET, que serão estudadas em seguida.

A principal diferença entre o MOSFET e o ISFET ou SEGFET está no eletrodo de porta. Apesar do princípio de operação ser o mesmo, o efeito de campo é causado não pela aplicação de um potencial, mas pela alteração da concentração iônica em uma solução, ou seja, no potencial da interface eletrólito-óxido.

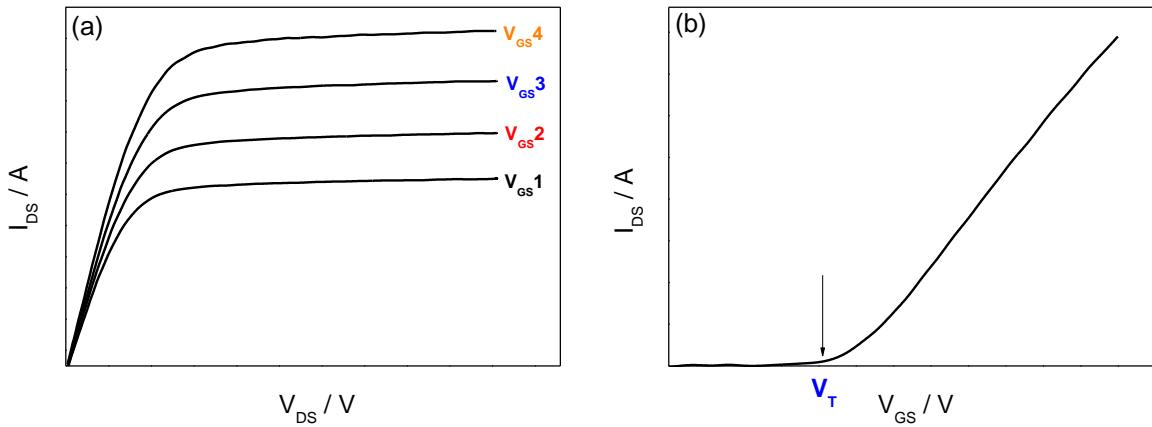


Figura 3.6 – Curvas características de um MOSFET. (a) Curva I_{DS} x V_{DS} para diversos valores de V_{GS} e
(b) curva I_{DS} x V_{GS} , para um pequeno valor de V_{DS} (~ 200 mV).

O ISFET foi introduzido por Bergveld em 1970 (80) e consiste de um MOSFET com a porta metálica substituída por um eletrodo de referência em solução de determinado pH, como mostrado na Figura 3.7, assim, é possível fazer uma curva análoga a Figura 3.6a, mantendo V_{GS} constante e alterando-se o pH da solução, ou analogamente com a Figura 3.6b, mantendo V_{DS} constante.

Devido a troca da porta metálica, podemos reescrever a Equação 3.6 adequada ao ISFET:

$$V_T = E_{ref} - \psi + \chi_{sol} - \frac{\theta_{Si}}{e} - \frac{Q_{SS} + Q_{ox} + Q_B}{C_{ox}} + 2\phi_f \quad (3.6)$$

O termo que representava a porta (θ_M) é anulado pois não há mais metal, incluindo-se os parâmetros referentes ao potencial no eletrodo de referência (E_{Ref}), potencial superficial de dipolo em virtude da solução (χ_{Sol}), e do potencial de superfície na interface óxido-eletrólito (ψ), ou seja, o termo V_T não é mais uma constante, pois depende agora dos potenciais agindo na interface.

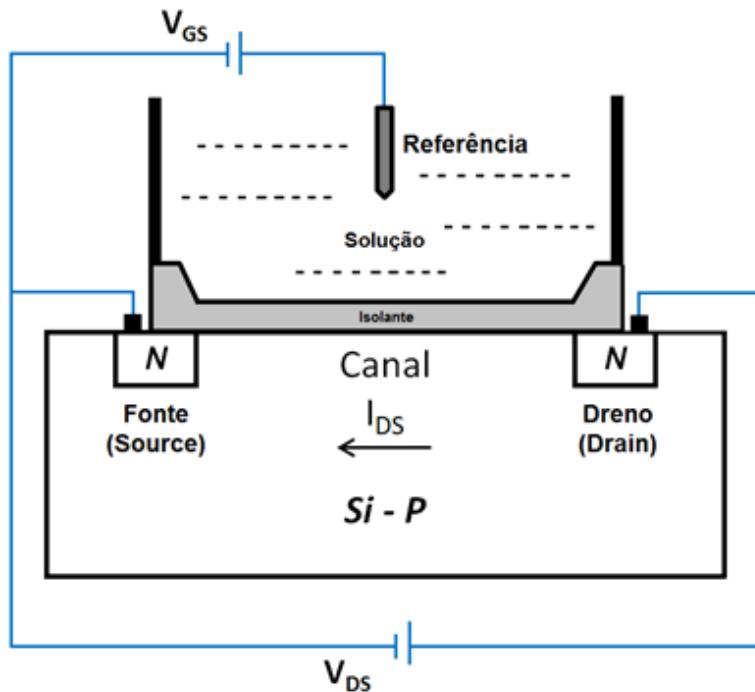


Figura 3.7 – Estrutura de um ISFET. O eletrodo de porta de um MOSFET é substituído por um eletrodo de referência contido na solução eletrolítica em contato com o material isolante.

O FET de porta estendida foi proposto primeiramente por Van der Spiegel em 1983 (81) e aprimorado por Chi *et al* em 2000 (82), cuja configuração está representada na Figura 3.9, recebendo o nome de SEGFET. O ISFET é um dispositivo amplamente utilizado e caracterizado, de modo que é interessante a sua introdução devido a aplicação teórica do seu funcionamento como sensor de pH estendido no âmbito do SEGFET, ou seja, seu princípio de operação é o mesmo: modulação da corrente dreno-fonte via alteração do potencial de superfície na camada sensível. Portanto, as equações que descrevem o comportamento elétrico de um ISFET são as mesmas para o SEGFET.

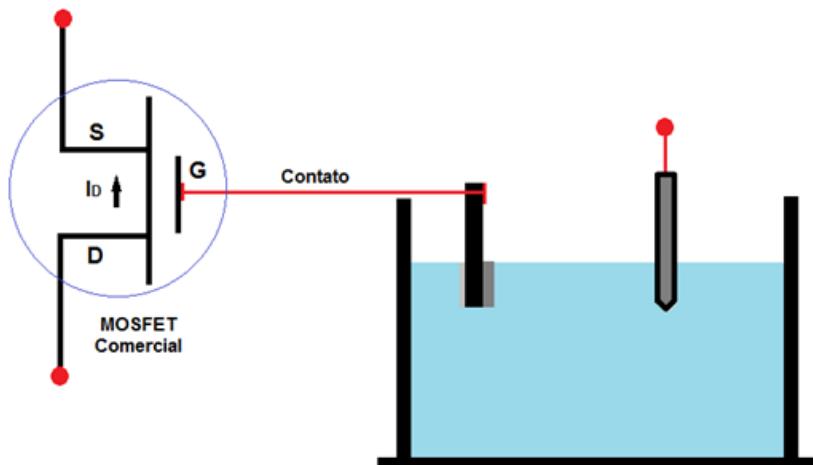


Figura 3.8 – Estrutura de um SEGFET, como proposto por Chi (82). Aplica-se uma tensão no eletrodo de referência e lê-se a resposta na membrana sensível conectada ao MOSFET comercial.

Com a modificação do valor de V_T para o caso em que a porta metálica do MOSFET é substituída, é possível obter o valor correto para a corrente I_{DS} . Como dito anteriormente, a Equação 3.6 é constituída de constantes, com exceção de ψ , sendo este portanto o fator responsável pela modulação de V_T , é o termo responsável pela sensibilidade do ISFET ao pH do eletrólito, que controla a dissociação/associação de íons na interface (27). Estudar os fatores que influenciam no potencial na superfície da interface eletrólito-óxido é fundamental para a construção de imunossensores, pois é a partir da alteração de ψ que se baseia todo o processo de detecção. Sendo assim, a próxima seção é dedicada ao estudo deste potencial, aplicável para ambas as plataformas utilizadas na construção dos imunossensores.

3.3 Potencial de circuito aberto

A seção 3.2 desenvolveu o funcionamento dos FETs como sensores de pH, mais especificamente no escopo deste trabalho, o denominado SEGFET. No entanto, utilizou-se outro dispositivo transdutor de sinal, o AI INA 111, cujo mecanismo de detecção também se baseia na alteração do potencial ψ , embora neste último caso seja de maneira direta, enquanto que no SEGFET a detecção é indireta, através da modulação de V_T e I_{DS} .

É interessante, portanto discutir este fenômeno de detecção conhecido como potencial de circuito aberto (OCP, do inglês *Open Circuit Potential*), ou seja, a medida de variações que ocorrem na interface eletrólito-óxido através da alteração da densidade de carga na camada de moléculas immobilizadas devido a sua interação com o analito (83).

O potencial ψ é dependente do pH e é descrito através do modelo de sítio de ligação (*site-binding*) (84-85), que sugere que a superfície dos óxidos anfotéricos (A) apresentam espécies químicas em três formas distintas: negativas (AO^-), neutras (AOH) e positivas (AOH_2^+). Dessa forma, as seguintes reações de ligação ocorrem da superfície do óxido, ou seja, na membrana sensível:



Além disso, em sistemas aquosos ocorre a formação espontânea de um fenômeno conhecido como dupla-camada (*double-layer*), apresentada na Figura 3.9, através da adsorção de grupos carregados, como especificado nas Equações 3.7 e 3.8 para superfícies de óxidos. Dizer que a formação ocorre espontaneamente implica que a variação da energia de Gibbs neste processo é negativa. Esta energia é proveniente não apenas de interações eletrostáticas entre os íons, mas principalmente de forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e efeitos de solvatação (86).

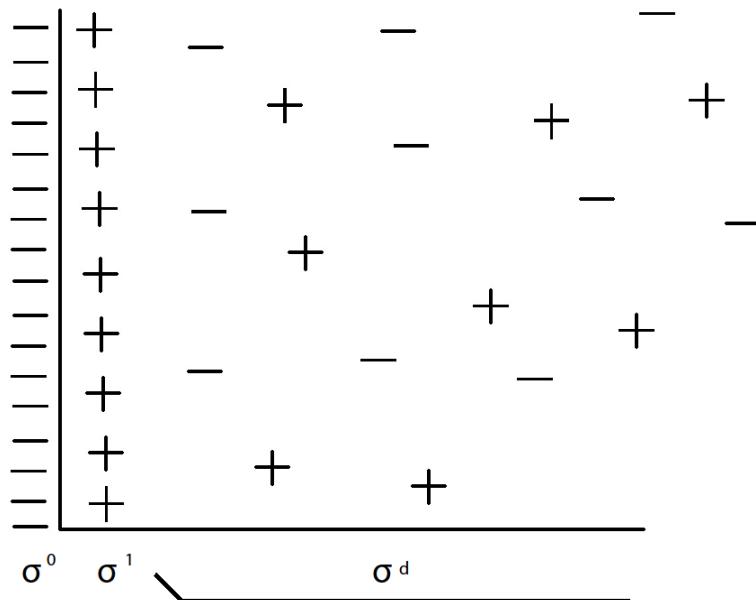


Figura 3.9 – Representação da constituição da dupla-camada: cargas superficiais (σ^0), camada de Stern ou Helmholtz (σ^1) e camada de carga difusa (σ^d).

Considerando a dupla-camada como um todo, da forma como está representada na Figura 3.9, ela é formada pelas cargas inerentes à superfície (σ^0), uma fina camada de cargas opostas às da superfície (σ^1) que se encontram adsorvidas, conhecida como camada de Stern ou de Helmholtz e uma camada que se entende um pouco além da superfície, composta de contraíons de maneira mais diluída conhecida como camada difusa (σ^d) (*diffuse electric double-layer*).

Neste ponto, algumas definições são importantes. A densidade de carga da parte difusa, σ^d é dada pela Equação 3.9:

$$\sigma^d = \int_0^{\infty} \rho(x) dx \quad (3.9)$$

Onde $\rho(x)$ é a densidade espacial de carga à uma distância x da superfície, que pode ser escrita na forma da Equação 3.10:

$$\rho(x) = z e n(x) \quad (3.10)$$

Onde z é o número de carga do íon (positivo ou negativo), e a carga elétrica elementar e $n(x)$ é o número de contraíons a uma distância x da superfície. Considerando a dupla-camada como um todo, ele é sempre eletricamente neutra, considerando o somatório das densidades de carga presentes, mostrado na Equação 3.11:

$$\sigma^0 + \sigma^1 + \sigma^d = 0 \quad (3.11)$$

Isto significa dizer que há um equilíbrio na dupla-camada, ou seja, o potencial químico (μ_q) do íon (Equação 3.12) deve ser constante para todos os valores de x , promovendo uma distribuição de Boltzmann dos contraíons para qualquer x (Equação 3.13, conhecida como Equação de Nernst) (87):

$$\mu_q = ze\psi + k_B T \log n(x) \quad (3.12)$$

$$n(x) = n_0 e^{-ze\psi/k_B T} \quad (3.13)$$

A Equação de Poisson, combinada com a distribuição de Boltzmann, forma a Equação de Poisson-Boltzmann (PB). A solução desta equação (representada na Equação 3.14) fornece o potencial de interface ψ utilizado na descrição de interações eletrostáticas entre moléculas em soluções iônicas (88-89), com uma densidade de carga superficial n_0 :

$$\begin{aligned} \nabla^2 \psi &= \frac{d^2 \psi}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\epsilon_0 \epsilon} \\ \frac{d^2 \psi}{dx^2} &= -\frac{zen_0}{\epsilon_0 \epsilon} e^{-ze\psi/k_B T} \end{aligned} \quad (3.14)$$

Este tratamento que aborda superfícies planas para eletrólitos simétricos (z:z) é conhecido como teoria de Gouy-Chapman (GC) e tem grande similaridade com a teoria de

Debye-Hückel (DH). Simplificadamente, a diferença entre as duas consiste no fato de que a teoria de GC não impõe nenhuma restrição acerca do valor do potencial, enquanto que para DH trata-se apenas de potenciais pequenos e diluição infinita, ou seja, não apenas eletrólitos simétricos mas 1:1 (86-87).

Utilizando a aproximação de DH, obtemos a Equação 3.14 na forma simplificada:

$$\nabla^2 \psi = \kappa^2 \psi \quad (3.15)$$

Onde a constante κ é definida como:

$$\kappa = ze \sqrt{\frac{n_0}{2\epsilon_0 \epsilon k_B T}} \quad (3.16)$$

Uma introdução útil para resolução deste problema é a constante comprimento de Debye (λ_D), Equação 3.17:

$$\lambda_D = \kappa^{-1} = \sqrt{\frac{2\epsilon_0 \epsilon k_B T}{z^2 e^2 n_0}} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T}{2e^2 I}} \quad (3.17)$$

Onde I é a força iônica da solução, quando se trata de um íon ($I = n_0 z^2 e^2 / 2$) Para o caso de um polieletrólito, deve-se fazer a somatória sobre todos os íons presentes em solução, como na Equação 3.18:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (3.18)$$

Onde c_i é a concentração do íon em solução. Note que para construção de imunossensores, λ_D é um dos parâmetros de maior importância, pois determina a distância da superfície do eletrodo na qual é possível o dispositivo sentir a alteração de carga, ou seja, as moléculas immobilizadas na superfície devem se encontrar à uma distância $x < \lambda_D$ para que o sinal da interação Ab-Ag possa ser observado.

É interessante construir um dispositivo que apresente um máximo de sensibilidade, o que leva a investigação da interface eletrólito-óxido de modo a possibilitar a escolha do melhor óxido. Para isso, é útil isolar o potencial na membrana (ψ_m):

$$\psi_m = \frac{2,3 k_B T}{e} (pH_m - pH_s) \quad (3.19)$$

$$\psi_m = 59.3 (pH_m - pH_s) \quad (3.20)$$

E então analisar a sua variação em relação ao pH da solução (pH_s):

$$\frac{d \psi_m}{d pH_s} = -\frac{2,3 k_B T}{e} \alpha \quad (3.21)$$

$$\alpha = 1 / \left[\frac{2,3 k_B T C_m}{e^2 \beta_m} \right] + 1 \quad (3.22)$$

Onde β_m é a capacidade de tamponamento intrínseca da membrana e C_m representa a capacitância na superfície da membrana (90).

O parâmetro α descreve a sensibilidade ao pH para óxidos inorgânicos, e tende à um valor unitário quando β_m/C_m é elevado. O valor máximo de sensibilidade obtida é portanto 59.3 mV.pH⁻¹ a 25 °C, conhecido como sensibilidade Nernstiana (90). No entanto, é interessante analisar o efeito desta sensibilidade sobre o dispositivo imunossensor. Para ISFETs, se comparado o valor de V_{GS} entre um ISFET onde há apenas o óxido (V_{GS}^1) e um ISFET com a presença de uma proteína immobilizada na porta (V_{GS}^2), temos que a diferença entre estes valores, dada na Equação 3.23 é:

$$V_{GS}^2 - V_{GS}^1 = (1 - \alpha) \Delta \psi \quad (3.23)$$

Ou seja, se a sensibilidade do óxido é nernstiana, não há diferença que possa ser medida na superfície devido a presença de uma proteína, logo não é possível detectar a interação Ab-Ag e consequentemente a construção de imunossensores fica limitada a utilização de materiais não-nernstianos (28).

Como neste trabalho utilizou-se um SEGFET, onde a porta do MOSFET é substituída, optou-se pela escolha do material de porta como Au, que apresenta sensibilidade não-nernstiana de cerca de 30 mV.pH⁻¹ (91). No início desta seção comentou-se sobre a semelhança nos métodos de detecção entre o SEGFET e o AI, sendo assim, os resultados obtidos com relação ao tipo de material que deve ser utilizado se entende para ambas plataformas.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados no trabalho, a técnica utilizada para imobilização dos anticorpos bem como as técnicas de caracterização dos imunossensores obtidos. A configuração experimental e a respectiva calibração das plataformas utilizadas para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue também é descrita em detalhes.

4.1 Reagentes

Os fios de ouro utilizados para metalização foram comprados da Alfa Aesar (1 mm de diâmetro e 99% de pureza). Os anticorpos foram cedidos pela empresa DNApta, sendo a IgG (produzida em rato) comprada da empresa Abcam (produto ab41616) (92) e a IgY produzida e purificada por eles através dos ovos de galinhas imunizadas, assim como a proteína NS1. O restante dos reagentes são provenientes da Sigma-Aldrich (93) e foram utilizados sem purificações adicionais.

O tampão utilizado nas medidas é o fosfato salino (*Phosphate buffer saline - PBS*), cuja composição (94) para a concentração correspondente a 10 mM, ou como será utilizado no decorrer deste trabalho, 1X PBS, é a que segue na Tabela 4.1. Para 1 L de solução, recomenda-se que o tampão seja colocado no ultrassom por 10 min para que todos os sais adicionados sejam dissolvidos e depois o pH deve ser ajustado, se necessário, com NaOH 1 M até pH 7.

Tabela 4.1 – Sais utilizados e sua concentração correspondente para confecção de tampão 1X PBS, pH 7.4.

Sal	Massa Molecular (MM)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	150
KCl	74,55	3
Na ₂ HPO ₄	141,96	10
KH ₂ PO ₄	136,09	10

4.2 Limpeza e preparação dos substratos

Foram utilizados substratos de vidro BK7 para a deposição de ouro (Au) e posterior confecção dos eletrodos utilizados como plataforma sensível nos imunossensores. A limpeza das lâminas de vidro foi realizada através do tratamento em solução de permanganato de potássio (KMnO₄) a 0,5 g.L⁻¹ por 24 horas seguido de lavagem em água ultrapura em abundância. Em seguida os substratos foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20% por 2 horas e lavados em água ultrapura. Para facilitar o processo de secagem os substratos foram imersos em acetona (solução PA) sob aquecimento, ao entrar em ebulição os substratos são retirados e a secagem ocorre rapidamente ao ar livre.

Os substratos BK7 limpos são submetidos à técnica de evaporação, onde são depositados 30 nm de cromo (Cr) e 120 nm de Au. A adição de Cr sobre o vidro é necessária pois não há uma boa aderência entre o BK7 e do Au diretamente.

Devido a exposição que os eletrodos sofrem ao serem retirados da evaporadora e armazenados, é realizada uma última limpeza antes da imobilização dos anticorpos conforme os eletrodos forem sendo necessários, para garantir que não haja elementos orgânicos na superfície. Faz-se a lavagem em etanol (solução PA) durante 5 min e depois coloca-se em uma solução de KOH (5 mM) contendo 5% de H₂O₂ durante 10 min (95). Entre todas as etapas foi feita uma lavagem com água ultrapura. Os eletrodos são secos sob jato de N₂, estando prontos para o procedimento de imobilização do anticorpo.

4.3 Método de imobilização do anticorpo

Os substratos de vidro recobertos com Cr/Au foram imersos em uma solução etanólica de cisteamina (10 mM) por 24 horas e depois lavados no mesmo solvente (etanol) para retirada do material fracamente ligado (26). Esse procedimento garante a formação de uma SAM como grupos amina expostos, cuja protonação advém da lavagem em água ultrapura. Após a lavagem em água, incuba-se os eletrodos já modificados em uma solução de glutaraldeído (2,5% v/v) durante 1 hora, seguida de lavagem em água e secagem sob fluxo suave de N₂ para não danificar o filme.

Para a imobilização covalente do anticorpo (IgG ou IgY em tampão 1X PBS), faz-se a deposição (*drop*) de 10 µL de solução a 0.2 mg.mL⁻¹ diretamente sobre o eletrodo modificado. Aguarda-se 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4 °C e lava-se em seguida com tampão 1X PBS. Finalmente, faz-se o bloqueio dos possíveis sítios de ligação remanescentes com solução de BSA (albumina do soro bovino) a 1% (10 mg.mL⁻¹) ou etanolamina (50 mM) em 1X PBS durante 30 min à temperatura ambiente, seguida de nova lavagem no tampão. O eletrodo deve então ser armazenado em tampão 1X PBS a 4 °C até o uso. A Figura 4.1 resume o protocolo de imobilização utilizado.

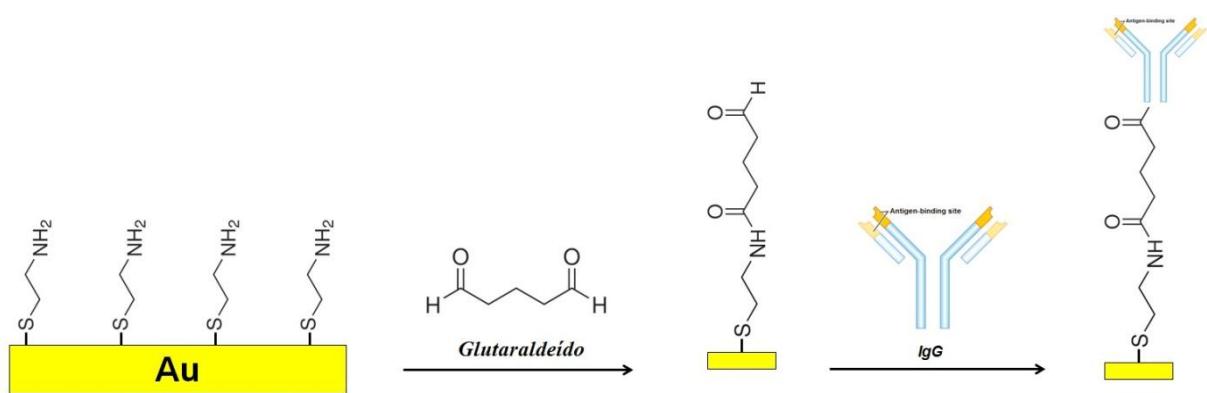


Figura 4.1 – Etapas do processo de imobilização do anticorpo.

4.4 Configuração experimental do imunossensor

Neste trabalho foram construídos imunossensores utilizando dois dispositivos: um MOSFET com a porta substituída por um eletrodo de referência, assumindo a configuração de SEGFET e um amplificador de instrumentação operando no modo de potencial de circuito aberto. No primeiro caso monitora-se a corrente I_{DS} no canal do transistor e no segundo caso faz-se a leitura da variação de tensão no tempo. Os dados são coletados através de um multímetro Keithley 195A comandado por computador via porta USB/GPIB, cuja leitura é feita através de um programa desenvolvido na plataforma LabVIEW 7.1. A Figura 4.2 mostra o multímetro utilizado nos experimentos e os dispositivos escolhidos para a realização das medidas.

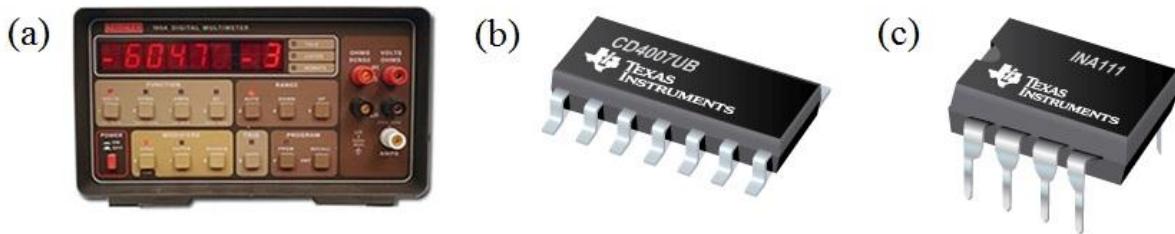


Figura 4.2 – (a) Multímetro Keithley 195A utilizado para medir tensão e corrente. Representação do (b) MOSFET CD4007UB e (c) AI INA 111 utilizados na fabricação de imunossensores.

4.4.1 Configuração do SEGFET

O primeiro sistema de medida é constituído de um circuito integrado (CI) CD4007UB que contém diversos MOSFET no mesmo chip. Optamos por escolher um MOSFET tipo N, em específico o correspondente aos pinos 3 (porta), 4 (fonte) e 5 (dreno) da

Figura 4.3. Nessa configuração, o eletrodo de porta é estendido (conectado) ao imunossensor (eletrodo contendo o anticorpo immobilizado), logo, pode ser considerado que a mesma é substituída por um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e a solução de medida, onde fecha-se o circuito (20).

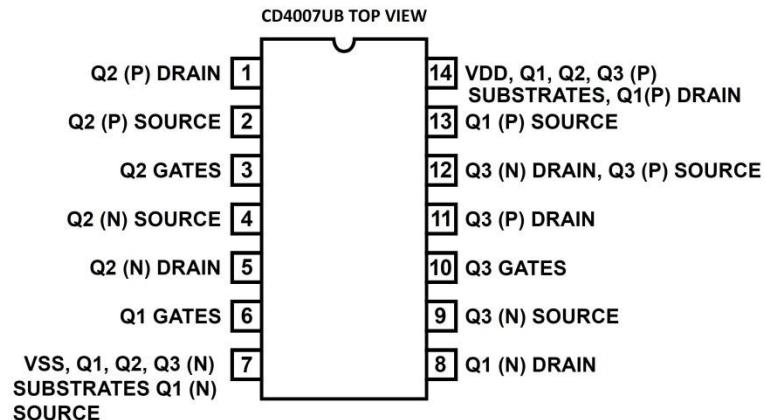


Figura 4.3 – Pinagem do MOSFET CD4007UB.

Aplica-se uma tensão dreno-fonte ($V_{DS} = 1.5 \text{ V}$) e uma tensão porta-fonte ($V_{GS} = 1.5 \text{ V}$), monitorando-se a corrente no dreno-fonte (I_{DS}) com o tempo, de modo que o MOSFET opera no modo de saturação (96). O eletrodo de trabalho (filme de Au modificado com o anticorpo) e o eletrodo de referência são imersos em solução tampão de força iônica consideravelmente baixa (0.01X PBS).

A ligação do circuito é feita de maneira a monitorar a alteração da corrente I_{DS} no canal, ou seja, aplica-se V_{GS} no eletrodo de referência e fecha-se o circuito com a membrana sensível em solução ligada ao pino 3, fazendo com que V_{GS} real aplicada no FET seja a tensão sentida pela membrana. Para monitorar I_{DS} , fazemos com que a tensão V_{DS} passe pelo multímetro pela entrada correspondente a leitura de corrente, ou seja, está funcionando como um amperímetro, e a saída – o terra do multímetro – é ligado ao pino 5.

A medida da concentração de NS1 é realizada depois de decorrido certo tempo de estabilização, ou seja, a corrente I_{DS} deve estar constante no tempo, e então uma alíquota conhecida de proteína NS1 é adicionada à célula de medida. A variação da corrente no tempo

até nova estabilização, resultado da interação antígeno/anticorpo é então monitorada. A Figura 4.4 apresenta o sistema com um MOSFET na transdução do sinal do imunossensor proposto.

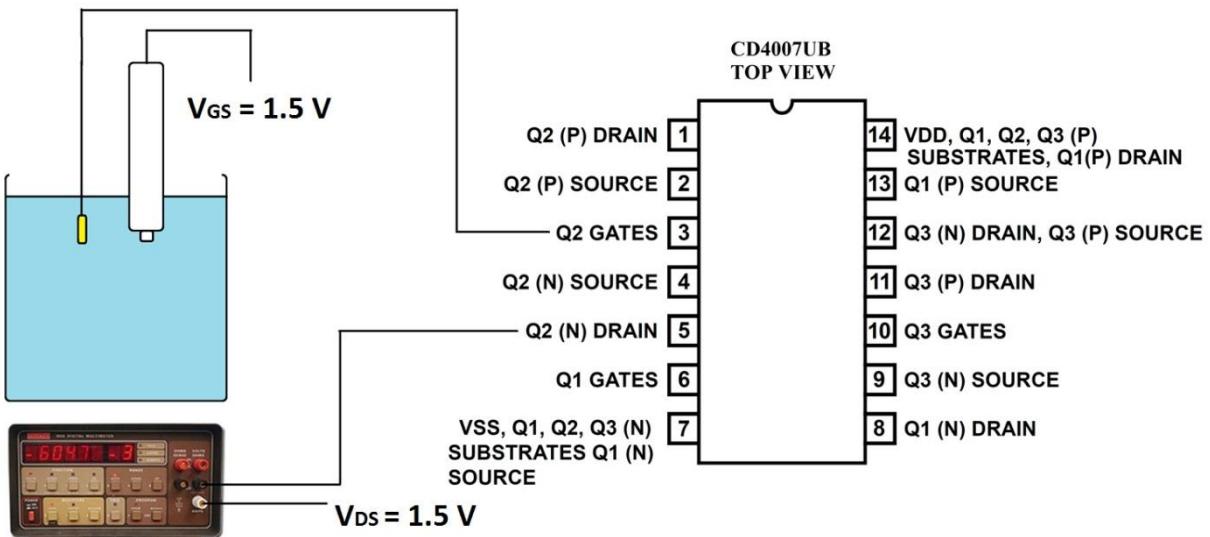


Figura 4.4 – Esquema do imunossensor utilizando o MOSFET CD4007UB.

4.4.2 Configuração utilizando AI

O AI INA 111 possui um FET na entrada, com grande impedância, de modo que a leitura dos dados é muito precisa. O ganho (G) é definido por um resistor externo de acordo com a Equação 4.1, sendo que neste caso optou-se por utilizar o AI como seguidor de tensão, de modo que o ganho é unitário, ou seja, não há resistor externo ligado. Neste caso, a impedância de entrada do AI corresponde à sua impedância de entrada nominal, ou seja, máxima.

$$G = 1 + \frac{50 \text{ k}\Omega}{R_G} \quad (4.1)$$

O imunossensor baseado no AI INA 111, cujo diagrama de pinagem está representado na Figura 4.5, tem a vantagem de não necessitar de uma fonte de tensão variável, entretanto, ele precisa ser alimentado por um potencial entre ± 6 e ± 15 V para funcionar corretamente (97). Para isso foi utilizado um par de baterias de 9 V, aplicando -9 V no pino 4 e $+9\text{ V}$ no pino 7.

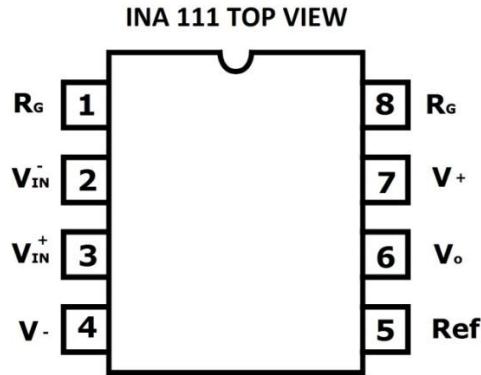


Figura 4.5 – Pinagem do AI INA 111.

O imunossensor é construído aterrando-se o eletrodo de referência e os dados são obtidos através da membrana sensível conectada ao pino 3, cuja leitura é feita através do pino 6 conectado ao multímetro – agora funcionando como voltímetro, de modo que as alterações medidas são no domínio de tensão e não de corrente, produzindo um sinal consideravelmente mais estável. Portanto, o circuito opera como um seguidor de tensão e a medida do OCP é realizada de forma direta.

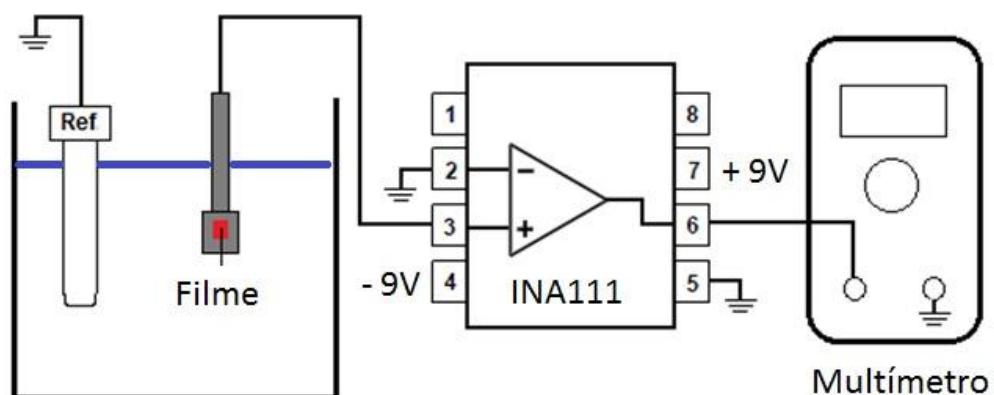


Figura 4.6 – Esquema do imunossensor utilizando o AI INA 111.

4.5 Calibração dos sistemas de medida

Antes da realização de qualquer medida deve-se sempre verificar se o sistema a ser utilizado está funcionando corretamente. Esta sessão explora como isso deve ser feito utilizando as curvas características apropriadas para cada imunossensor proposto.

O primeiro passo é comum e consiste em conferir o eletrodo de referência a ser utilizado no experimento, comparado a outro eletrodo de referência que não esteja sendo utilizado nos últimos dias. Mede-se a diferença de potencial entre os dois eletrodos de referência, esperando-se observar um valor constante, indicando que o eletrodo está estável. Este procedimento é necessário pois o uso do MOSFET implica na aplicação de tensão no eletrodo de referência. Mesmo sob um baixo potencial (1.5 V) até mesmo eletrodos de referência comerciais podem apresentar instabilidade quando polarizados e utilizados constantemente, apresentando uma lenta e contínua alteração no potencial. Isto faz com que o processo de estabilização necessário antes da realização da medida se torne extremamente longo, podendo passar de 1 h quando poderiam ser gastos apenas 15 min.

A principal razão para a medida entre os eletrodos é sua utilização nas medidas com o MOSFET – as medidas com o amplificador não implicam aplicação de tensão no eletrodo de referência, logo neste caso não ocorre alteração da estabilidade do eletrodo, embora seja aconselhável a verificação periódica no segundo caso também. A medida é feita aterrando-se um eletrodo (terra do multímetro) e medindo o potencial em relação ao outro (positivo ou negativo do multímetro), ambos inseridos em uma solução de KCl saturada (3 M).

A Figura 4.7 representa uma medida entre dois eletrodos de referência comerciais modelos R-682 da Analion. Observa-se uma ligeira variação no início característica da iniciação do multímetro, embora a medida seja praticamente constante durante todo o tempo. É importante notar que a variação está na ordem de μ V, ou seja, o experimento (adição de proteína NS1) apresenta alterações na ordem de mV, de modo que esta flutuação natural não representa uma interferência.

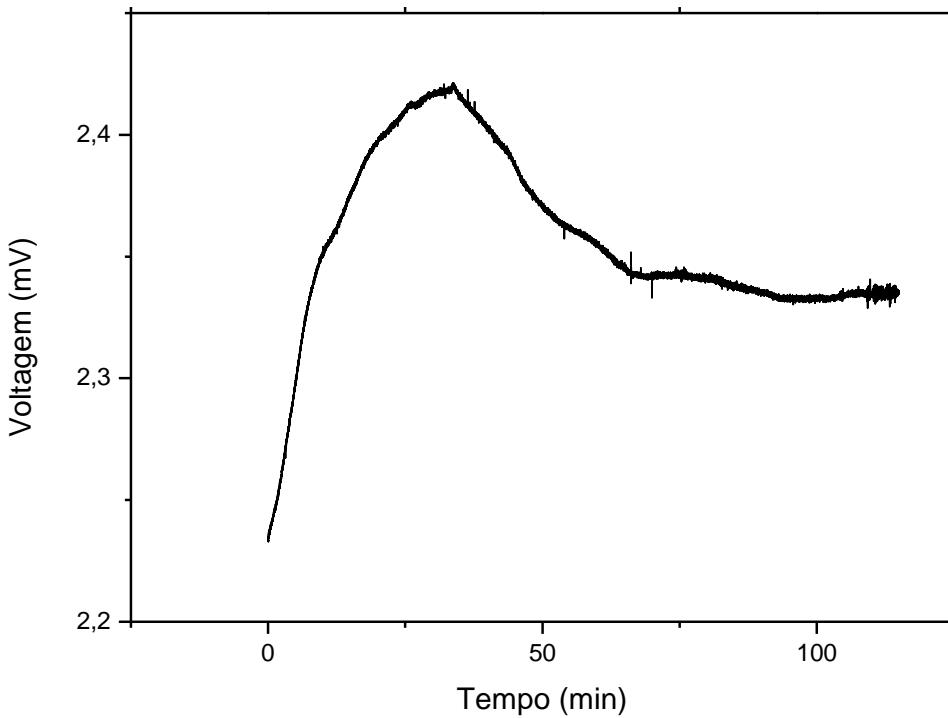


Figura 4.7 – Gráfico da medida comparativa entre dois eletrodos de referência comerciais Analion modelo R-682, visando verificar a estabilidade dos eletrodos através da observação de tensão constante.

Como explorado teoricamente no Capítulo 3, o MOSFET possui curvas características $I_{DS} \times V_{DS}$ e $I_{DS} \times V_{GS}$. Antes da montagem do circuito correspondente ao imunossensor SEGFET, reproduzimos as curvas características para comparação com o *datasheet* do MOSFET CD4007UB (96). A Figura 4.8 mostra a curva característica $I_{DS} \times V_{DS}$. A curva apresenta o comportamento esperado, ou seja, o formato de acordo com a Figura 3.6 e ainda em excelente concordância com o *datasheet* (96). Portanto, verificou-se que o transistor escolhido está funcionando corretamente.

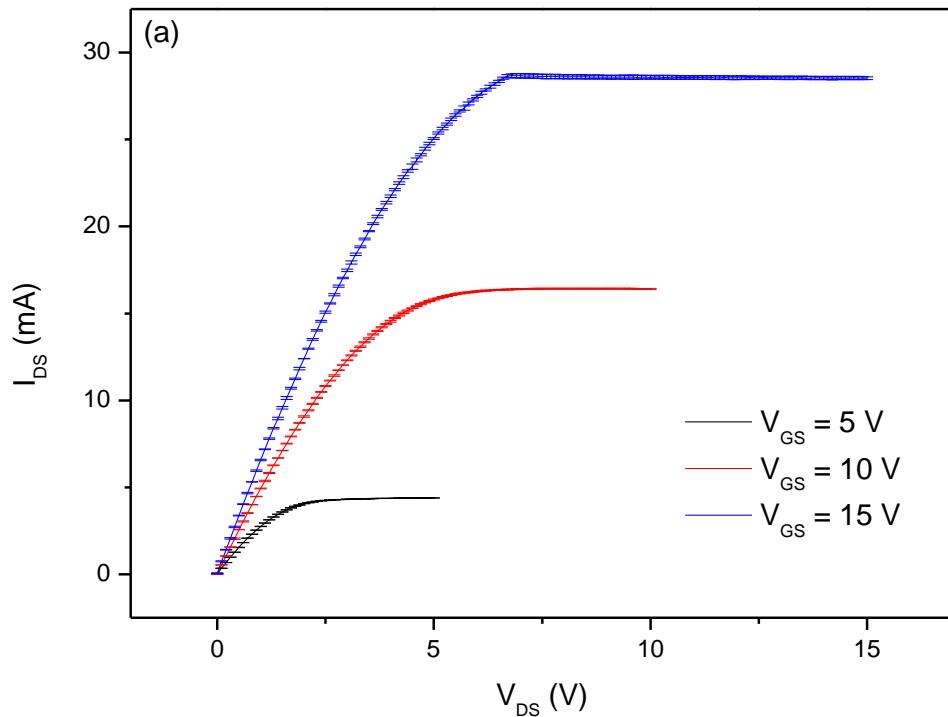


Figura 4.8 – Curva I_{DS} x V_{DS} característica do MOSFET.

Por sua vez, o AI INA 111 trabalha como um seguidor de tensão de ganho unitário na montagem de OCP proposta, ou seja, os dados obtidos na saída nada mais é que a leitura dos dados na entrada. Portanto espera-se a obtenção de uma reta de inclinação unitária, ao aplicarmos um potencial conhecido na entrada (pino 3), como mostrado na Figura 4.9. As flutuações da tensão de saída do AI estão na ordem de $1\text{ }\mu\text{V}$, um valor muito pequeno quando comparado com as variações de tensão típicas (da ordem de mV) medidas em nossos imunossensores.

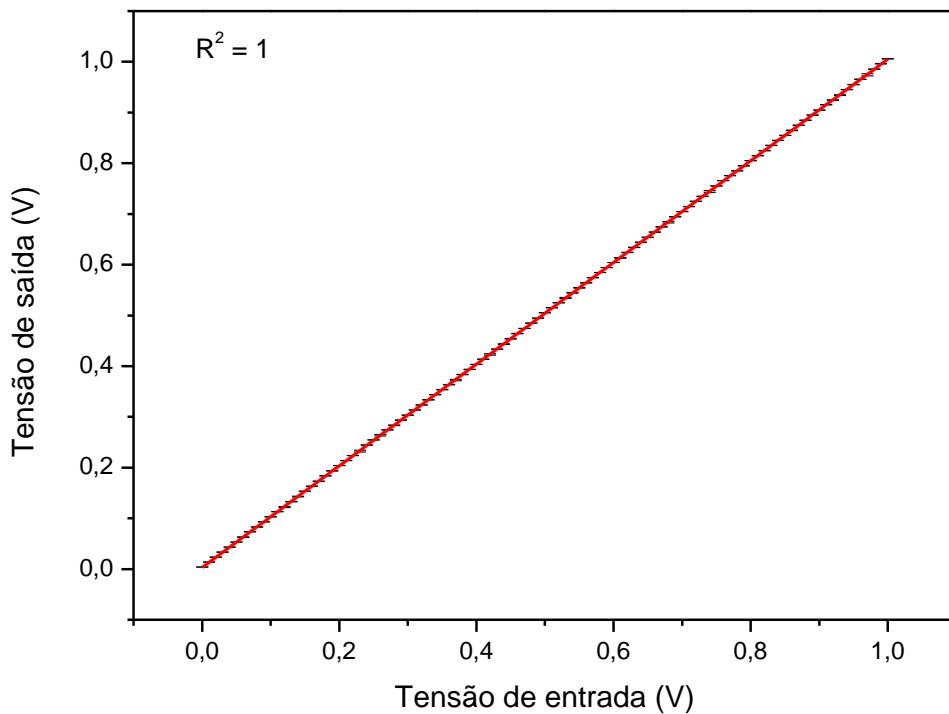


Figura 4.9 - Tensão de saída (medida no pino 6) em função em função da tensão de entrada (aplicada no pino 3) do amplificador de instrumentação INA 111.

4.6 Técnicas de caracterização da membrana sensível

Nesse trabalho foram utilizadas técnicas de microscopia (MEV, AFM e LSCM) para caracterização da superfície do substrato recoberto com Cr/Au e de cada passo do processo de imobilização. Além disso, utilizou-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica como técnica complementar de caracterização.

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) funciona com um feixe de elétrons que realiza a varredura da amostra, produzindo uma imagem virtual através da leitura da intensidade dos elétrons que chegam ao detector. É possível obter imagens de alta resolução, com até 300.000x de ampliação.

O microscópio utilizado foi um MEV modelo LEO-440, com detector de elétrons secundários, onde foi estudada a morfologia dos filmes de ouro antes e após o processo de limpeza. Como a amostra é metálica não há necessidade de nenhuma preparação especial.

4.6.2 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica muito interessante na análise de superfícies sólidas na escala nanométrica. É possível obter imagens 3D e analisar propriedades locais como rugosidade, altura, entre outras.

Coloca-se uma ponta de prova no final de um *cantilever*, que pode ser considerado como uma mola, medindo-se a força entre a ponta de prova e a amostra, utilizando-se a Lei de Hook (Equação 4.2):

$$F = -k \cdot x \quad (4.2)$$

Onde F é a força medida, k a constante de mola do *cantilever* e x a distância entre a ponta de prova e a amostra.

Conforme a ponta percorre a amostra, um feixe de laser incide sobre o *cantilever* e o ângulo de reflexão do feixe muda de acordo com a distância entre a ponta de prova e a amostra, de modo que a incidência no fotodetector ocorre em pontos diferentes de acordo com essa distância, formando a imagem, representado na Figura 4.10.

O AFM utilizado foi um Bruker Dimension Icon com uma ponta de prova de 10 nm de diâmetro. As medidas foram realizadas no modo *tapping*.

Foram feitas imagens dos filmes em cada etapa de imobilização, com o intuito de observar as diferenças entre uma etapa e outra e garantir que o anticorpo foi efetivamente imobilizado. As amostras devem estar secas durante a medida, para evitar que a ponta de prova se molhe, provocando interferências na imagem. Como entre todos os passos de imobilização é feita lavagem no solvente, os filmes foram colocados em estufa à vácuo a temperatura ambiente por cerca de 4 horas, para garantir a ausência de moléculas de água. Utilizou-se o software *NanoScope Analysis* para análise das imagens.

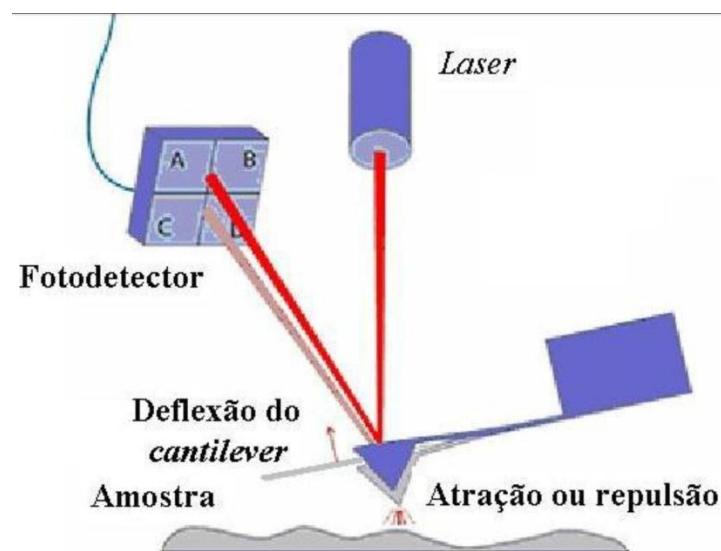


Figura 4.10 –Esquema de funcionamento de um AFM (98).

4.6.3 Microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser

A microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser (Laser scanning confocal microscopy - LSCM) permite a obtenção de imagens a partir de planos focais da amostra, ou seja, em seu interior, desde que a amostra seja fina o suficiente para permitir a passagem da luz. Para que o detector seja atingido apenas pelos feixes provenientes do plano focal, existe um anteparo com um pequeno orifício denominado *pinhole*, que bloqueia os feixes provenientes dos planos que não estão em foco, permitindo a obtenção de imagens de alta resolução. A Figura 4.11 apresenta um esquema do funcionamento da microscopia LSCM:

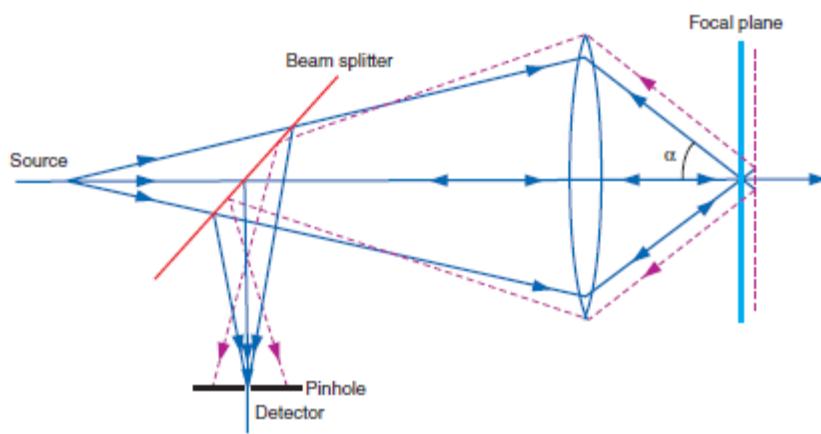


Figura 4.11 – Esquema simplificado de funcionamento de um microscópio confocal (99).

Neste trabalho foi utilizado um microscópio confocal Zeiss LSM 780. Como fonte de excitação foi utilizado laser de argônio (linha espectral em 488 nm) e objetiva com aumento de 63x em água. As imagens foram feitas em solução (IgG-FITC e IgY-FITC a 0.2 mg.mL⁻¹) para observação dos anticorpos e nas mesmas condições para observação dos substratos de Cr/Au e as respectivas etapas no processo de immobilização.

4.6.3.1 Protocolo de marcação de anticorpos

Para obtenção de imagens de fluorescência usando LSCM, os anticorpos foram marcados com fluoresceína (Fluorescein 5(6)-isothiocyanate – FITC), representada na Figura 4.12, que possui uma massa molecular de 389,38 g.mol⁻¹. A FITC é uma molécula que sofre degradação facilmente, portanto as soluções devem ser feitas no dia em que forem ser utilizadas e protegidas da luz com papel alumínio.

A fluoresceína é uma molécula muito utilizada na marcação de proteínas, principalmente anticorpos. O grupo isotiocianato reage com grupos amino-terminais e aminas primárias em proteínas. Para obter um bom rendimento no procedimento de marcação, deve-se fazer uma solução de FITC em excesso em relação à proteína de interesse. A FITC apresenta um pico de excitação em $\lambda_{abs} = 495\text{ nm}$ e a emissão ocorre em $\lambda_{emi} = 525\text{ nm}$. Depois da reação é possível verificar o rendimento através de espectroscopia UV-Vis ou espectroscopia de fluorescência.

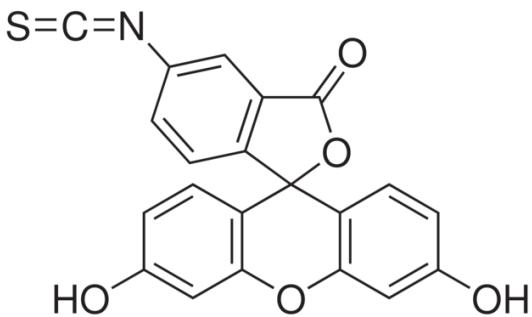


Figura 4.12 - Molécula de FITC.

Segundo a folha de dados da FITC da Sigma-Aldrich (100) a razão de FITC em relação a proteína, chamada razão F/P, pode ser estimada através da absorbância em 495 nm e 280 nm, devendo obter-se um valor entre 0.3 e 1.0, de acordo com a Equação 4.3. Valores menores não produzem um bom sinal e valores maiores provocam um ruído de fundo elevado.

$$\text{Molar } \frac{F}{P} = \frac{MM}{389} \times \frac{Abs_{495}/195}{[Abs_{280} - (0.35 \times Abs_{495})]/E^{0.1\%}} \quad (4.3)$$

Onde MM é a massa molecular da proteína, Abs é o valor da absorbância obtido através de espectroscopia UV-Vis e E^{0.1%} é o coeficiente de extinção molar da proteína.

Preparou-se uma solução de FITC a 2 mg.ml⁻¹ em tampão 1X PBS (próximo de sua máxima solubilidade em água) e uma solução de anticorpo (IgG ou IgY) a 0.2 mg.ml⁻¹ em 1X PBS. Uma alíquota da solução de FITC foi dicionada a solução de anticorpo de modo que a [FITC] seja cerca de 20x maior que a [Ab]. Como a marcação foi realizada com dois tipos de anticorpos (é importante lembrar que sua massa molecular é diferente: MM_{IgG} = 150 kDa e MM_{IgY} = 180 kDa), a alíquota de FITC adicionada não é a mesma para cada solução. O tempo de reação é de 1 h à temperatura ambiente, sob agitação e protegido da luz.

Após o término da reação, deve ser feito o procedimento de diálise, para retirada das moléculas de FITC em excesso que não reagiram. A solução foi colocada em uma membrana de 50 kDa e esta em um bêquer de 1 L contendo tampão 1X PBS. O sistema deve ser mantido a 4 °C sob agitação *overnight*, e devem ser realizadas cerca de duas trocas do tampão, garantindo que toda FITC excedente saia da membrana. Depois desse procedimento, mede-se a absorbância da solução tampão para garantir que não houve vazamento de anticorpo pela membrana e a absorbância da solução da membrana, onde devem ser observadas a banda do

anticorpo e da FITC. A solução de Ab-FITC deve ser armazenada em um *eppendorf* a 4 °C até o uso.

4.6.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica que permite a observação da alteração da superfície através da mudança de resistência e consequentemente da transferência de elétrons. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Autolab Eco Chemie PGSTAT302 potenciostato/galvanostato, utilizando-se uma solução 0.1 M KCl contendo 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/-4}$ como prova redox. O eletrodo de trabalho foi analisado em cada etapa de imobilização, com uma placa de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 M KCl).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados do trabalho e suas implicações. A seção 5.1 apresenta os métodos de caracterização utilizados, a seção 5.2 mostra o comportamento dos dispositivos como sensor de pH e finalmente, a seção 5.3 apresenta o imunossensor proposto para detecção de proteína NS1 do vírus da dengue.

5.1 Caracterização da membrana sensível

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados dos métodos de caracterização utilizados para observação da morfologia dos imunossensores construídos.

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

Primeiramente, realizou-se o estudo da superfície do substrato de vidro (BK7) recoberto com Cr/Au com o intuito de observar a homogeneidade da superfície e estudar o efeito do processo de limpeza sobre a mesma. A Figura 5.1 representa as imagens obtidas por MEV antes e depois do tratamento com etanol.

A Figura 5.1a corresponde ao substrato sem lavagem. A cobertura do substrato foi bem realizada mas observa-se que a lavagem realmente é necessária antes do uso e aplicação em imunossensores devido a presença de materiais orgânicos e outras substâncias contaminantes, cuja presença afetaria a formação posterior da SAM, consequentemente reduzindo a área recoberta e a disponibilidade de anticorpos, influenciando na sensibilidade do imunossensor. Por outro lado, fica clara a homogeneidade da Figura 5.1b, que representa o substrato após a lavagem com etanol. A diferença antes e depois do tratamento mostra claramente a eficiência do processo de lavagem, que retira com sucesso a maioria dos contaminantes.

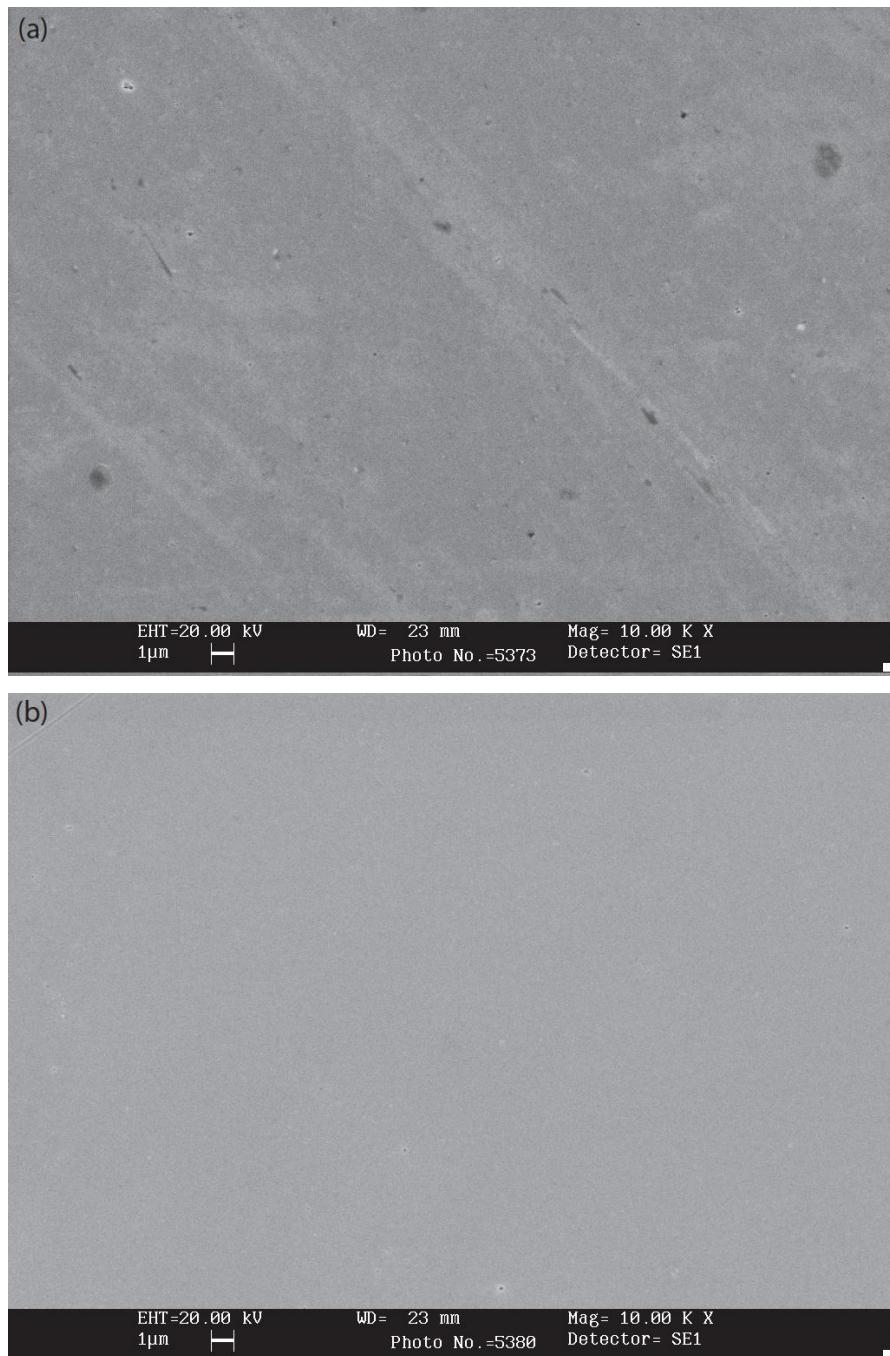


Figura 5.1 – Imagens de MEV dos substratos de Au (a) antes e (b) depois da limpeza com etanol.

5.1.2 Microscopia de força atômica

A técnica de AFM, diferentemente da MEV, permite a observação de superfícies em uma resolução mais acurada, de modo que é possível analisar as alterações passo a passo do processo de imobilização através da comparação do valor quadrático médio (RMS, do inglês *root mean square*) correspondente.

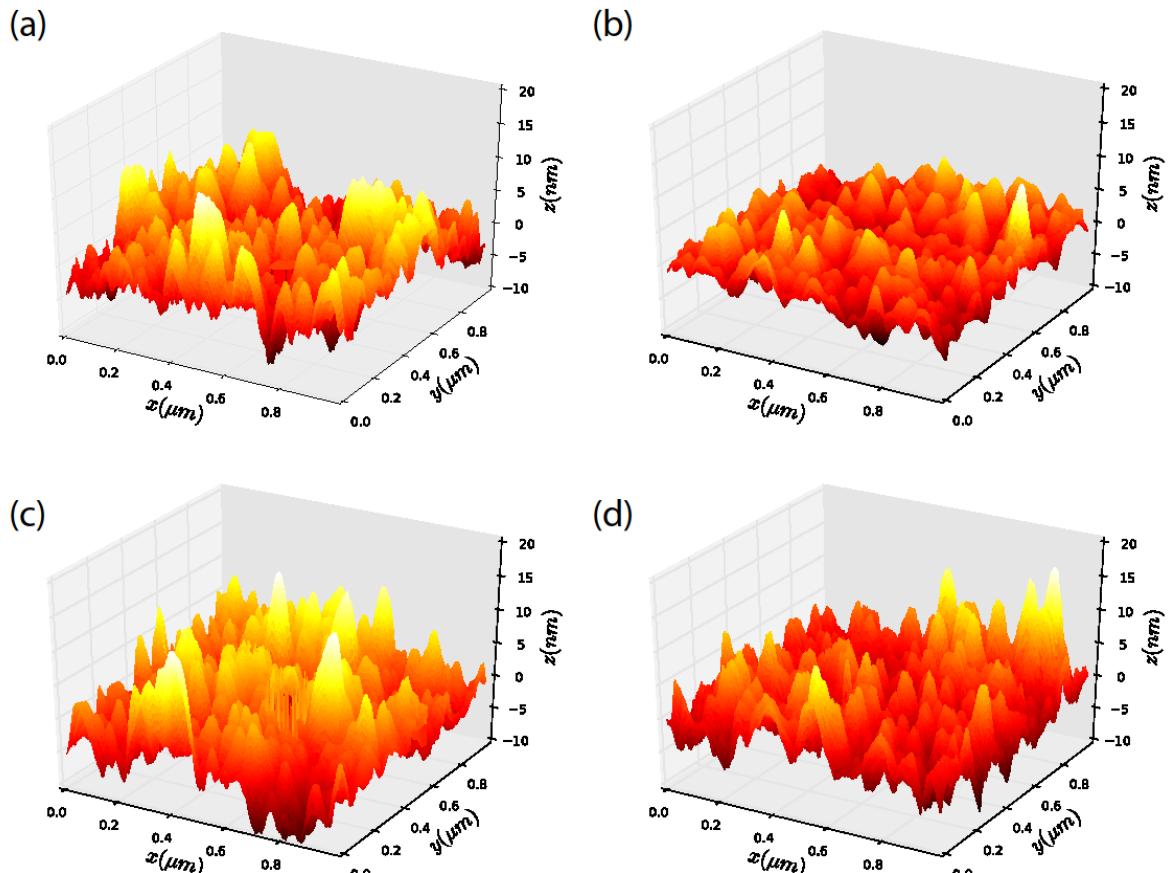


Figura 5.2 – Imagens de AFM correspondente aos passos de imobilização: (a) substrato recoberto com Au, (b) Au-Cisteamina, (c) Au-Cisteamina-GA e (d) Au-Cisteamina-GA-Ab.

A Figura 5.2 apresenta as imagens de AFM obtidas. Observa-se que a superfície do substrato recoberto com Cr-Au possui diversas granulações, devido ao processo de vaporização do Au, com altura média de 12 nm. A Figura 5.2a mostra apenas a cobertura com Cr-Au, com um RMS_{Au} de 3.2 nm. A próxima etapa (Figura 5.2b), formação de SAM de cisteamina, apresenta um RMS_{Au-Cis} de 3 nm, ou seja, não há grande alterações devido ao pequeno tamanho na molécula, como esperado, assim como a ligação com GA (Figura 5.2c), que possui um $RMS_{Au-Cis-GA}$ de 3.2 nm.

Por outro lado, a presença do anticorpo (Figura 5.2d) faz com que $\text{RMS}_{\text{Au-Cis-Ga-Ab}}$ seja 5.2 nm, ou seja, o aumento no valor médio indica a presença do anticorpo no eletrodo.

5.1.3 Microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser

Utilizou-se LSCM com o objetivo de analisar a cobertura dos substratos com o anticorpo e ainda estudar o melhor método de imobilização deste, comparando as técnicas de *dipping* e *dropping*. Primeiramente, seguindo o protocolo descrito na seção 4.6.3.1, é preciso verificar a eficiência do procedimento de marcação do anticorpo, neste caso a IgY, com FITC, utilizando-se a Equação 4.3. Após a diálise, mede-se o espectro de absorção da solução, do qual são obtidos os valores de absorbância dos picos correspondentes ao anticorpo em 280 nm e da FITC em 495 nm. Substituindo os valores obtidos na Equação 4.3, e sabendo-se que o valor do coeficiente de extinção ($\varepsilon_{0.1\%}$) da IgY é 1,33 (101), ligeiramente inferior que a IgG, cujo $\varepsilon_{0.1\%}$ é 1.4 (102), obtemos o valor para a razão molar F/P de 0.96, como mostra as Equações 5.1 e 5.2:

$$\text{Molar } \frac{F}{P} = \frac{180000}{389} \times \frac{0.011/195}{[0.040 - (0.35 \times 0.011)]/1.33} \quad (5.1)$$

$$\text{Molar } \frac{F}{P} = 0.96 \quad (5.2)$$

Esse valor se encontra próximo do limite superior (Molar F/P = 1), porém dentro do intervalo desejado, mostrando que o protocolo utilizado promoveu com sucesso a marcação IgY-FITC.

Devido ao tamanho dos anticorpos, há facilidade na formação de grandes aglomerados proteicos em solução, que são prejudiciais no processo de imobilização, pois dificultam a difusão das moléculas de Ab para o filme, causando até certa perda de atividade, devido a indisponibilidade dos sítios de ligação ao Ag (103-104). Assim, optamos por fazer a diálise diretamente com a solução diluída (0.2 mg.mL^{-1}), na concentração utilizada para a imobilização, a fim de evitar esta aglomeração, já presente em soluções de 1 mg.mL^{-1} (observado em microscopia confocal de varredura, não mostrado). A Figura 5.3a mostra as

moléculas de Ab em solução. Observa-se que a imagem espectral (1024 x 1024 pixels, onde cada pixel corresponde a um espectro) apresenta grande homogeneidade, sem a presença de aglomerados, ideal para a realização do procedimento de imobilização.

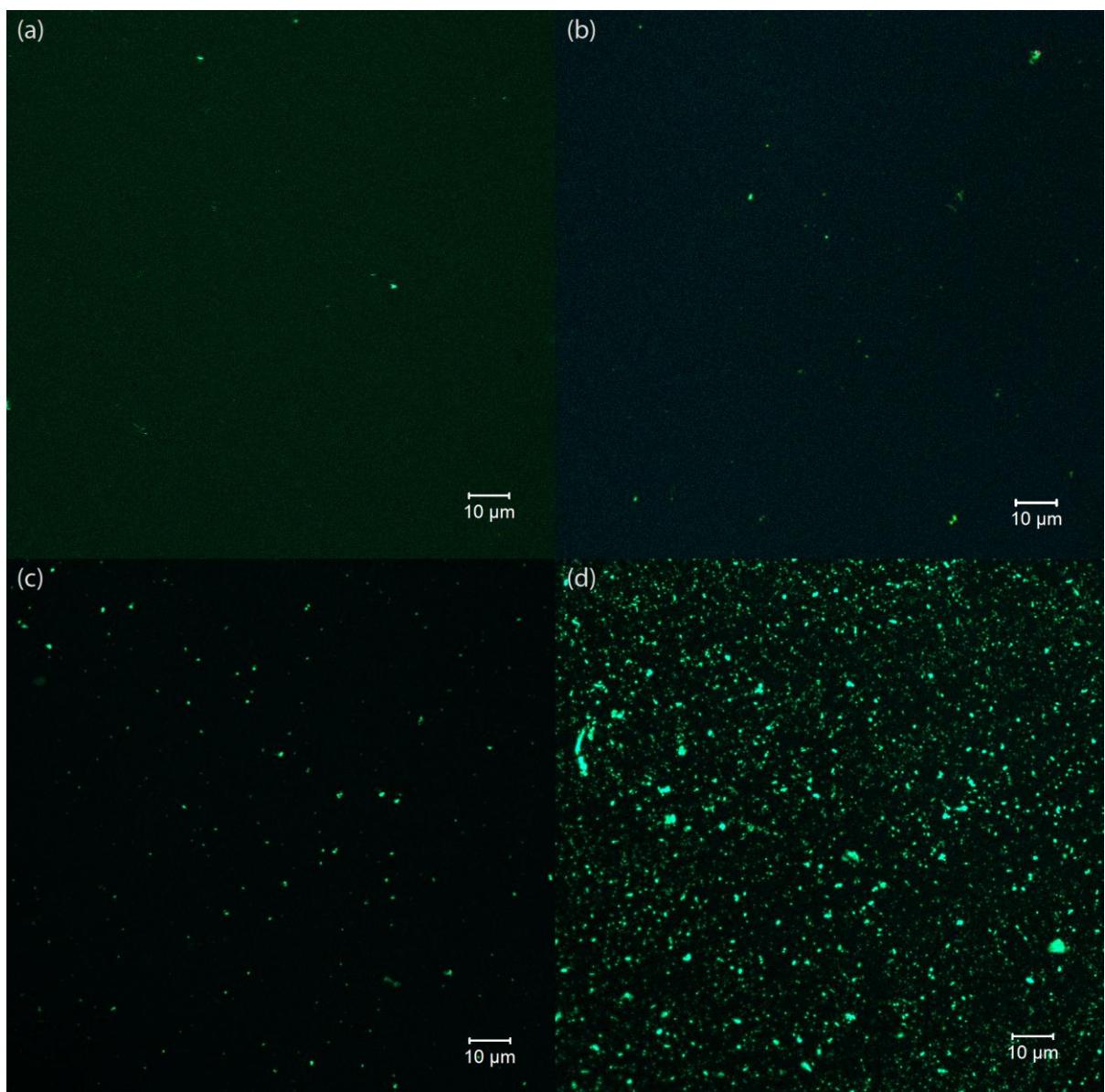


Figura 5.3 – Imagens de LSCM (a) da solução de anticorpo a 0.2 mg.mL^{-1} , (b) do substrato recoberto com cisteamina e dos filmes preparados através da imobilização de anticorpo utilizando (c) *dipping* e (d) *dropping*.

Procurou-se também avaliar a cobertura do filme, através da análise da cobertura com cisteamina. Como a molécula de cisteamina é muito pequena ($\text{MM} = 77.15 \text{ g.mol}^{-1}$), não seria viável a diálise após a reação com FITC. Foi realizado então a tiolização da superfície de Au normalmente com cisteamina, e depois o *dipping*, ou seja, o substrato Au-Cis foi mergulhado em uma solução de FITC por cerca de 2 horas, lavado extensivamente com água e então

armazenado em água até o uso. Como a cisteamina possui grupos de aminas primárias expostas, espera-se que ocorra a reação formando Cis-FITC diretamente no substrato.

A Figura 5.3b mostra a fluorescência da cobertura da superfície do substrato, indicando que a SAM foi formada homogeneamente, como esperado, devido ao grande tempo de imersão na solução de cisteamina (24 horas). Desta forma, é correto assumir que a superfície apresenta excelente distribuição de sítios disponíveis para imobilização do anticorpo.

Nesta última etapa estudou-se dois métodos de imobilização, visando obter o método que apresentasse uma maior cobertura, mas sem uma densidade muito alta de proteína por área, já que no caso de imunossensores, é necessário um certo espaçamento entre as moléculas imobilizadas para obter um sinal com menor ruído e maior especificidade (105).

A superfície Au-Cis-GA foi deixada exposta a solução de IgY pelo mesmo período de tempo (1 hora) em ambos os casos (*dipping* e *dropping*). A Figura 5.3c/d representa a comparação entre os métodos, respectivamente. Observa-se que embora o *dipping* promova a ligação do Ab à superfície, é nítida a quantidade inferior de moléculas presentes. O método de *dropping* apresenta uma quantidade de ligação bem mais elevada, e apesar de apresentar algumas regiões de aglomeração, a cobertura se deu de modo a promover uma ligação espaçada entre as moléculas, que pode ser observada na Figura 5.4.

A partir de um corte transversal na imagem, é possível obter a intensidade da fluorescência na região do corte. A intensidade para o *dropping* chega até o dobro da intensidade para o *dipping*, e também pode ser observado através do valor médio, sendo $\bar{I}^{\text{dip}} = 0.17$ e $\bar{I}^{\text{drop}} = 0.62$, em unidades arbitrárias (u.a.). Entre os picos existem regiões de fluorescência nula, que chegam até 5 μm na Figura 5.4a e são um pouco menores na Figura 5.4b, afirmando que existe uma maior cobertura superficial pelas moléculas de Ab-FITC.

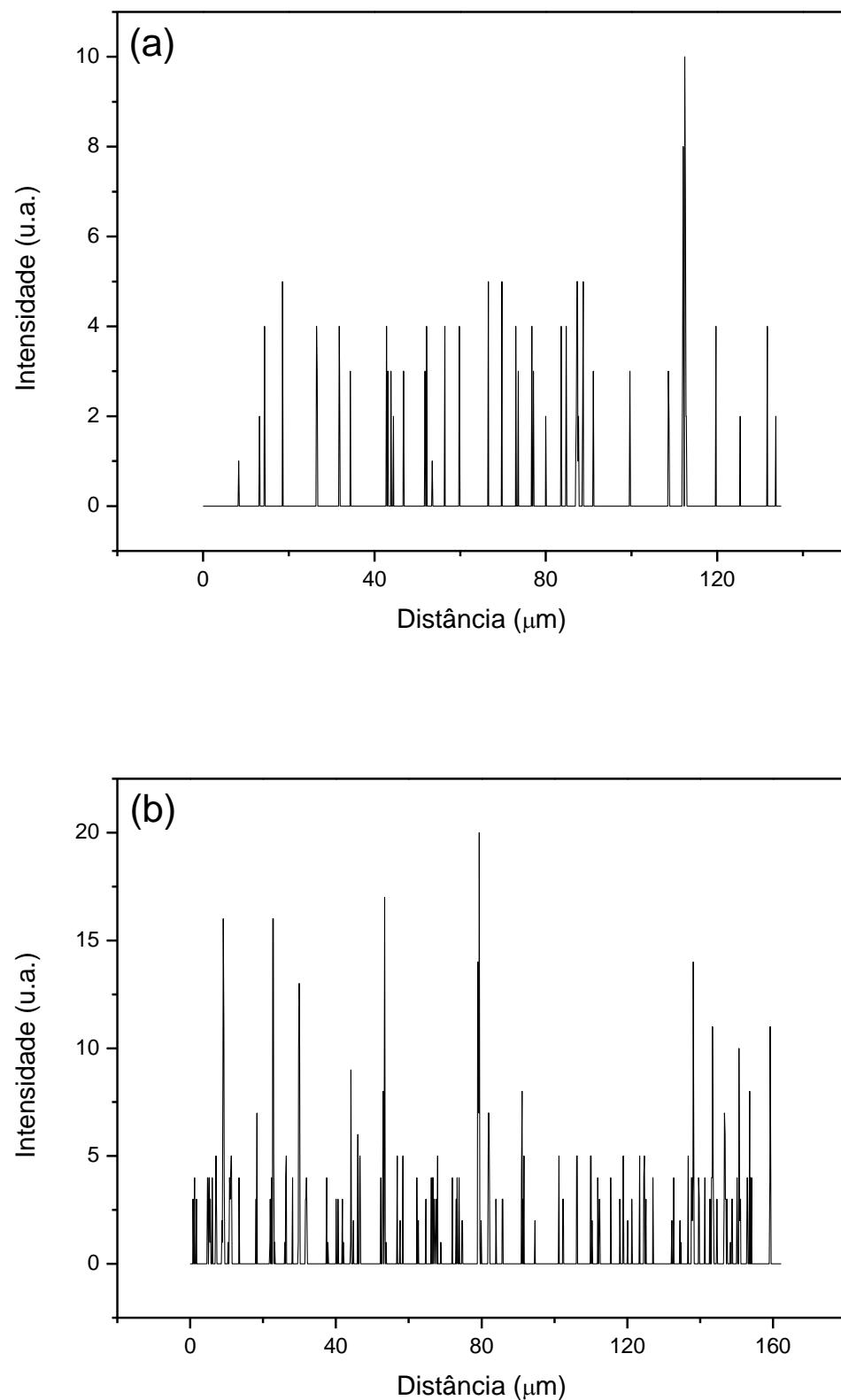


Figura 5.4 – Intensidades correspondentes ao corte transversal da imagem de fluorescência do método de imobilização por (a) *dipping* e (b) *dropping*.

5.1.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A EIS foi utilizada com o objetivo de observar as variações da impedância dos filmes no decorrer das etapas de imobilização para construção do imunossensor, de forma a caracterizar a ligação entre a molécula e a superfície do substrato. Uma medida típica apresenta um semi-círculo, cujas dimensões são proporcionais aos valores das impedâncias resistivas no eixo das abscissas e capacitivas nos eixos das ordenadas.

A Figura 5.5a apresenta os resultados obtidos para as diferentes superfícies discutidas na seção 5.1.3. A curva em preto representa apenas a superfície limpa do substrato de Au que apresenta um pequeno arco, ou seja, por ser um condutor, idealmente a resistência é nula, no entanto para casos reais sabe-se que qualquer superfície - mesmo que condutora - apresenta certa impedância capacitativa e resistiva.

A curva em vermelho, por sua vez, representa o primeiro passo do processo de imobilização, ou seja, a tiolização com cisteamina. Um efeito curioso é observado: a predominância do efeito difusivo sobre o resistivo. Isso acontece devido a monocamada carregada de cisteamina em solução (grupos NH_3^+), que provoca a rápida difusão dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/-4}$, inibindo os efeitos resistivo e capacitivo na interface (106-107).

Os passos seguintes, adição de GA (azul), Ab (verde) e Ag (rosa) apresentam sucessivos aumentos de impedância da superfície, como esperado. Além disso, é interessante notar que o aumento é mais expressivo na adição do anticorpo, devido ao seu tamanho comparado às outras moléculas, e também da proteína NS1.

Para corroborar os dados experimentais, fez-se um modelo de circuito equivalente, apresentado na Figura 5.5b, coincidente com o sistema do eletrodo em contato com a solução, adaptado do modelo de Ferreira *et al.* (107). No circuito, R_s corresponde a resistência da solução (KCl 0.1M), R_{CT} é a resistência correspondente a transferência de carga da oxidação e redução do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/-4}$, C_1 é a capacidade da dupla-camada, C_2 é capacidade da difusão e R_{dif} a resistência de difusão.

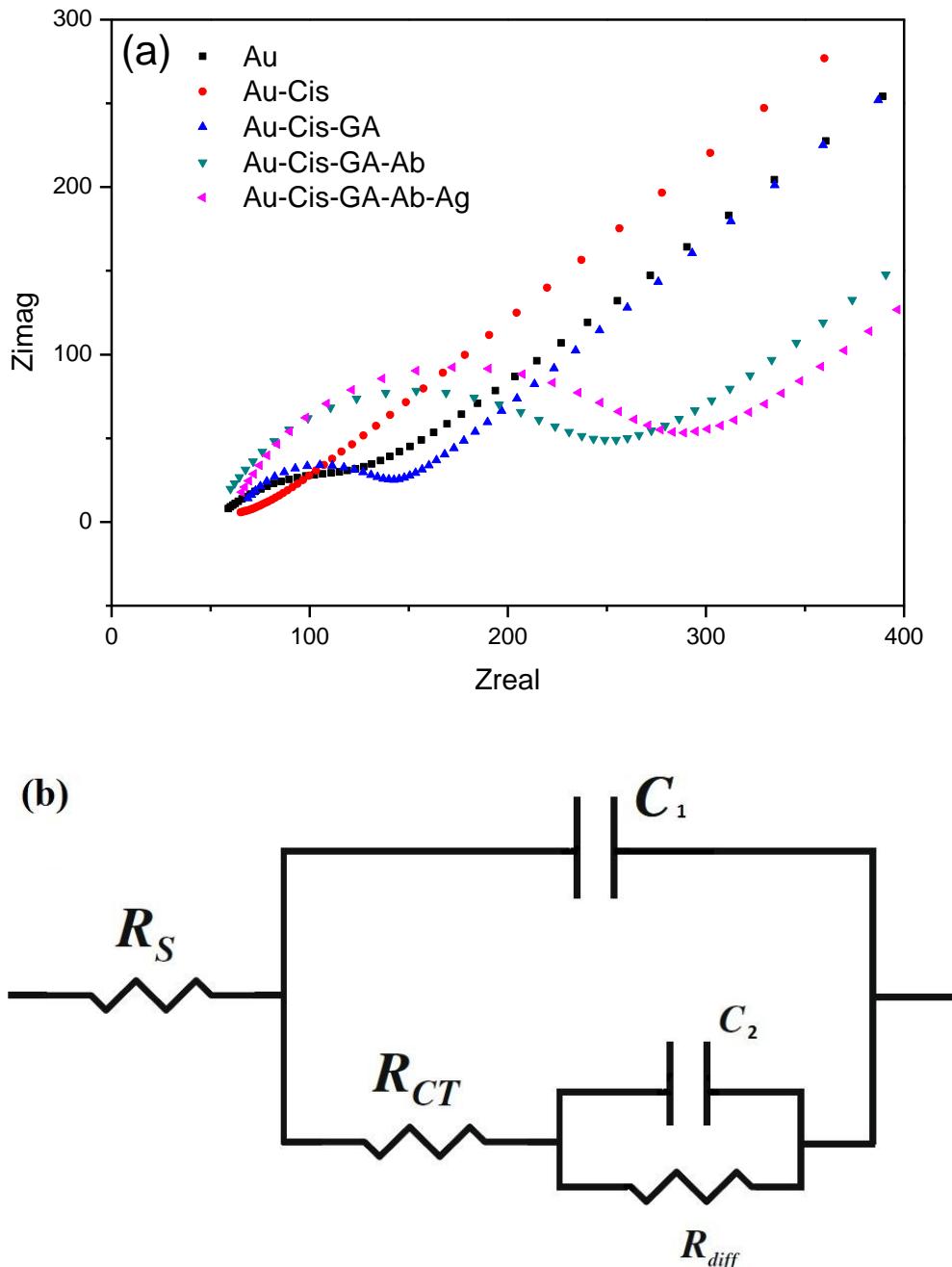


Figura 5.5 – (a) Representação das etapas de imobilização através de EIS e (b) modelo de circuito equivalente representando os dados experimentais correspondentes ao sistema Au-Cis-GA-Ab.

5.2 Aplicação das plataformas como sensores de pH

Após o processo de caracterização da membrana sensível, é necessário mostrar que as plataformas escolhidas são eficientes como sensores de pH e portanto capazes da detecção de alteração local de carga.

No caso da utilização do SEGFET, primeiramente foi realizada a escolha dos potenciais V_{DS} e V_{GS} , tendo em vista que um potencial elevado não poderia ser utilizado devido a instabilidade causada aos eletrodos de referência. Por outro lado uma corrente I_{DS} muito e pequena, isto é, da ordem de poucos μA , não é viável devido à resolução do multímetro.

A Figura 5.6 apresenta os resultados dos testes realizados na caracterização do MOSFET CD4007UB visando sua aplicação como imunossensor SEGFET. Primeiramente, foram analisadas valores mais altos de tensão, com V_{GS} entre 1 e 5 V, com passo de 1 V, para observar a ordem de grandeza da corrente obtida. Observa-se pela Figura 5.5a que quanto maior o valor de V_{GS} , mais elevado é o V_{DS} correspondente para que a corrente entre na região de saturação. Sendo assim, definimos o limite de $V_{GS} = 1.5$ V, pois valores de V_{DS} maiores que 2 V já afetam consideravelmente a estabilidade do eletrodo de referência.

Uma nova família de curvas, agora com um passo de V_{GS} menor, correspondente a 0.5 V, é apresentada na Figura 5.7b, onde observa-se que para $V_{GS} = 1$ V, a corrente $I_{DS} \sim 100 \mu\text{A}$, ou seja, é um valor da ordem do sinal da interação Ab-Ag e portanto é interessante a escolha de $V_{GS} = 1.5$ V para que haja uma margem superior no valor de I_{DS} em relação a ordem de grandeza do sinal, além disso, a medida será realizada na região de saturação do MOSFET.

Em seguida, fez-se as curvas características do MOSFET já utilizando os substratos recobertos com Au, imerso em tampão 0.1X PBS (pH 7.4), na configuração de SEGFET representadas na Figura 5.7. Se comparado com a Figura 5.6a para um mesmo valor de V_{GS} (1.5 V), vemos que a corrente na região de saturação é reduzida de 450 μA para cerca de 70 μA e também o valor de V_{DS} na região cai para 0.6 V. Isto acontece devido a transição da medida das curvas características no próprio transistor e da medida em solução, já que no segundo caso o valor real de V_{GS} que chega ao transistor não é mais 1.5 V, pois o valor medido corresponde a diferença de potencial na membrana, neste caso, a superfície do Au.

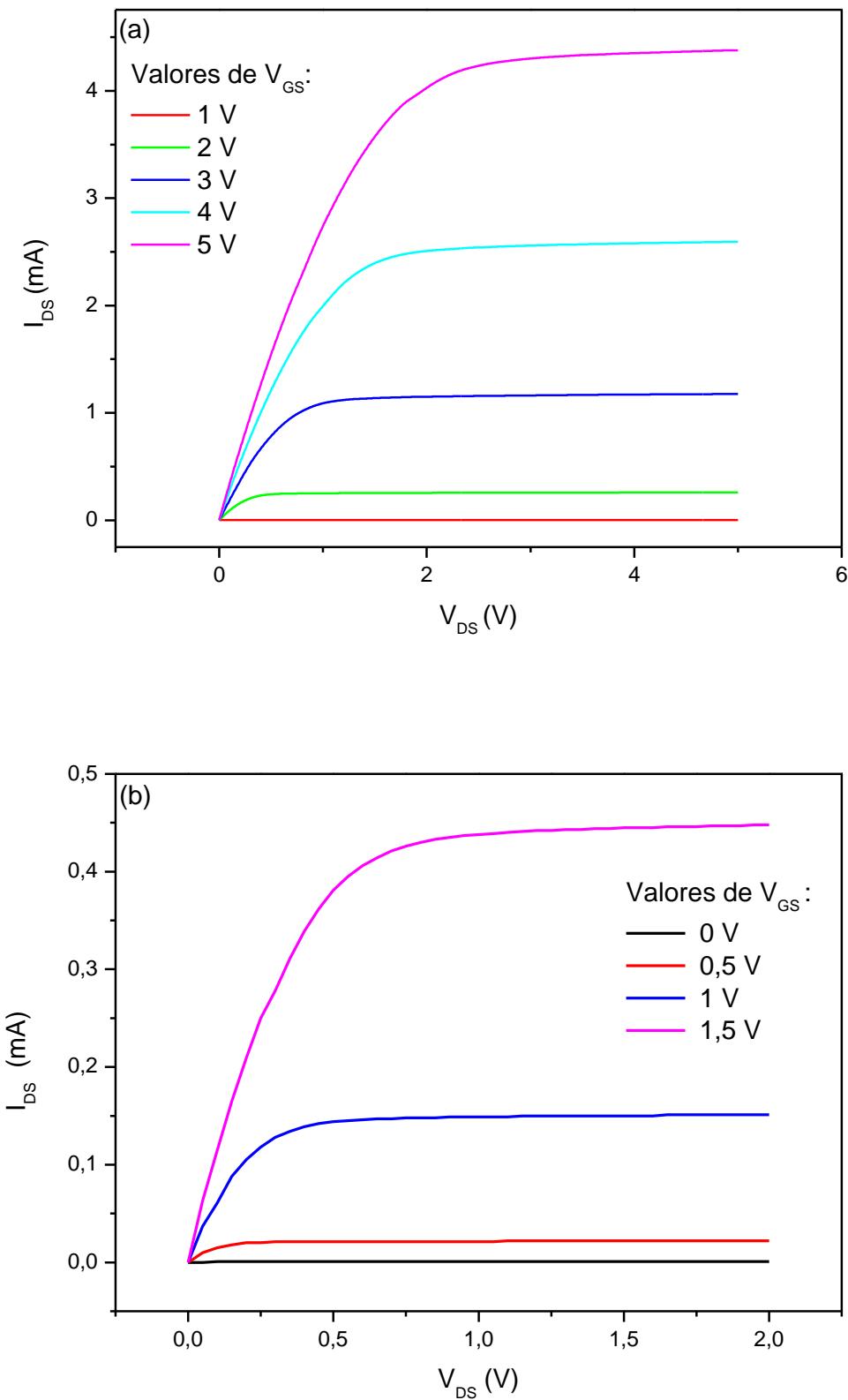


Figura 5.6 – Curvas I_{DS} x V_{DS} para análise dos valores de V_{DS} e V_{GS} a serem utilizados no SEGFET, com V_{GS} variando entre (a) [0 , 5] V e (b) [0 , 1,5] V.

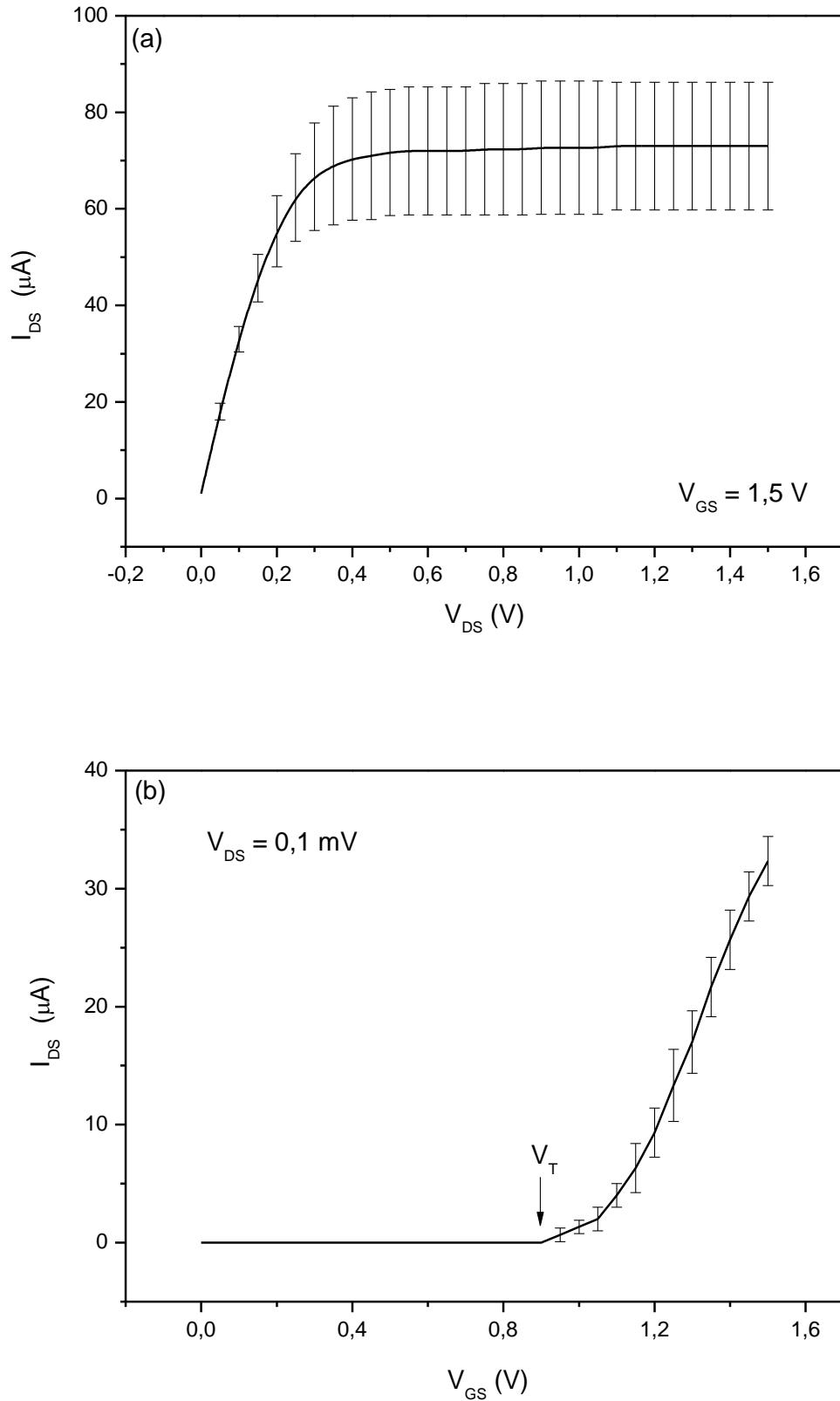


Figura 5.7 – Curvas (a) I_{DS} x V_{DS} ($V_{GS} = 1.5 \text{ V}$) e (b) I_{DS} x V_{GS} ($V_{DS} = 0.1 \text{ mV}$) com os substratos recobertos com Au em tampão 0.1X PBS (pH 7.4) na configuração de SEGFET.

Esta redução no valor de I_{DS} em solução mostra que este é um fator que deve ser levado em consideração na escolha do valor de V_{GS} , pois se na Figura 5.5b para $V_{GS} = 1$ V temos $I_{DS} \sim 100 \mu A$, quando utilizado em solução a redução no valor da corrente geraria problemas de resolução na medida e implicaria em uma corrente significativamente menor que o valor da interação Ab-Ag, portanto 1.5 V é de fato o valor mínimo de V_{GS} que pode ser utilizado.

Ainda, analisando a Figura 5.7b, onde fixa-se um pequeno valor de V_{DS} , é possível obter o valor da voltagem de limiar do transistor, $V_T = 0.9$ V. Ou seja, o MOSFET operando com o gate estendido e separado (SEGFET), apresenta as curvas características de um transistor MOS comum, com regiões linear e de saturação (27). É interessante ainda observar que na curva $I_{DS} \times V_{DS}$ o valor da corrente na região de saturação é de $(73 \pm 13) \mu A$, valor característico para o filme de Au em tampão, podendo ser observado com precisão nas Figuras 5.7 e 5.10.

Com os valores definidos de V_{GS} e V_{DS} em 1.5 V, seguimos para análise do comportamento do SEGFET como sensor de pH, cujos resultados podem ser vistos na Figura 5.8 e Tabela 5.1. Para ambas regiões ácida e básica partiu-se de solução tampão 0.1 X PBS (pH 7.5) e foram realizadas sucessivas adições no intervalo de tempo de 5 min de HCl 0.1 M e NaOH 0.1 M respectivamente. Como o tampão de medida do imunossensor (0.01X PBS) possui uma força iônica muito baixa, as alterações devido à adição de ácido ou base são muito abruptas, portanto optou-se por fazer o sensor de pH no tampão PBS com uma força iônica mais elevada (0.1X PBS), de modo a obter as respostas à alteração de pH de forma mais controlada. Um pHmetro foi colocado em contato com a solução e as variações foram anotadas separadamente, para confecção das Figuras 5.8c e d.

A adição de HCl provoca a subida da corrente I_{DS} devido ao aumento da concentração de íons H^+ , ou seja, a presença de cargas positivas em solução e consequentemente na superfície do Au provoca a indução de cargas negativas no canal do MOSFET, aumentando a corrente no canal. Analogamente, a adição de NaOH provoca o aumento de cargas negativas (OH^-), levando ao efeito oposto: repulsão de elétrons no canal, causando a redução de I_{DS} .

Os parâmetros da equação de reta ($y = a + bx$) são mostrados na Tabela 5.1, na qual b representa a sensibilidade do eletrodo de ouro, onde se observa um aumento nas regiões ácida e básica do ajuste de reta (r^2) devido ao processo de limpeza, ou seja, o tratamento Etanol + KOH + H_2O_2 é eficiente para aplicação como imunossensor na configuração SEGFET, o que pode ser verificado também através da redução pela metade do erro associado as medidas.

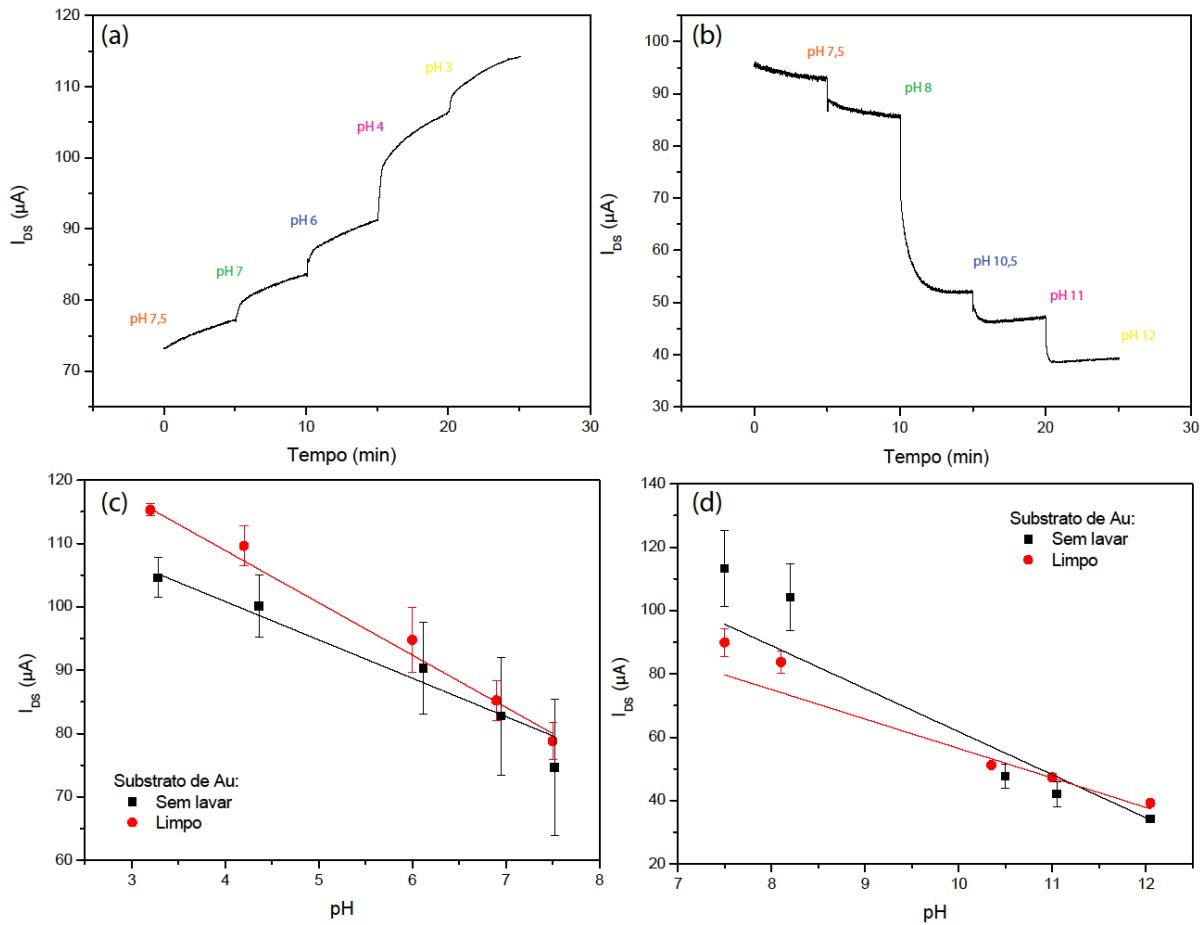


Figura 5.8 – Curvas demonstrativas I_{DS} x Tempo da variação do pH para as regiões (a) ácida e (b) básica. Curvas da sensibilidade I_{DS} x pH para as regiões (c) ácida e (d) básica, mostrando a diferença entre o uso de substratos antes e após o processo de limpeza.

Note que a realização do experimento em duas etapas se deve ao fato de que a alteração do pH foi realizada simultaneamente com a medida no tempo, ou seja, se a solução inicial parte de um pH muito ácido ($pH \sim 2$) ou muito básico ($pH \sim 12$) ocorre uma saturação devido ao excesso de íons em solução para se chegar na região oposta de pH. Logo, optou-se por iniciar o experimento em pH neutro, ou seja, pH 7.5, e cobrir separadamente as regiões ácida e básica.

Tabela 5.1 – Dados das curvas referentes ao SEGFET como sensor de pH para as regiões ácida e básica, utilizando substratos de Au antes e após a limpeza.

Parâmetros	pH_{ácido}		pH_{básico}	
	Sem lavar	Limpo	Sem lavar	Limpo
r^2	0.955	0.994	0.854	0.894
$(a \pm \Delta a)$ (μA)	125 ± 3	142 ± 1	197 ± 33	149 ± 17
$(b \pm \Delta b)$ ($\mu A \cdot pH^{-1}$)	-6.1 ± 0.7	-8.3 ± 0.3	-13.6 ± 2.7	-9.3 ± 1.6

O sensor de pH utilizando o AI foi realizado utilizando-se o mesmo procedimento, cujos resultados pode ser observados na Figura 5.9 e Tablea 5.2 abaixo.

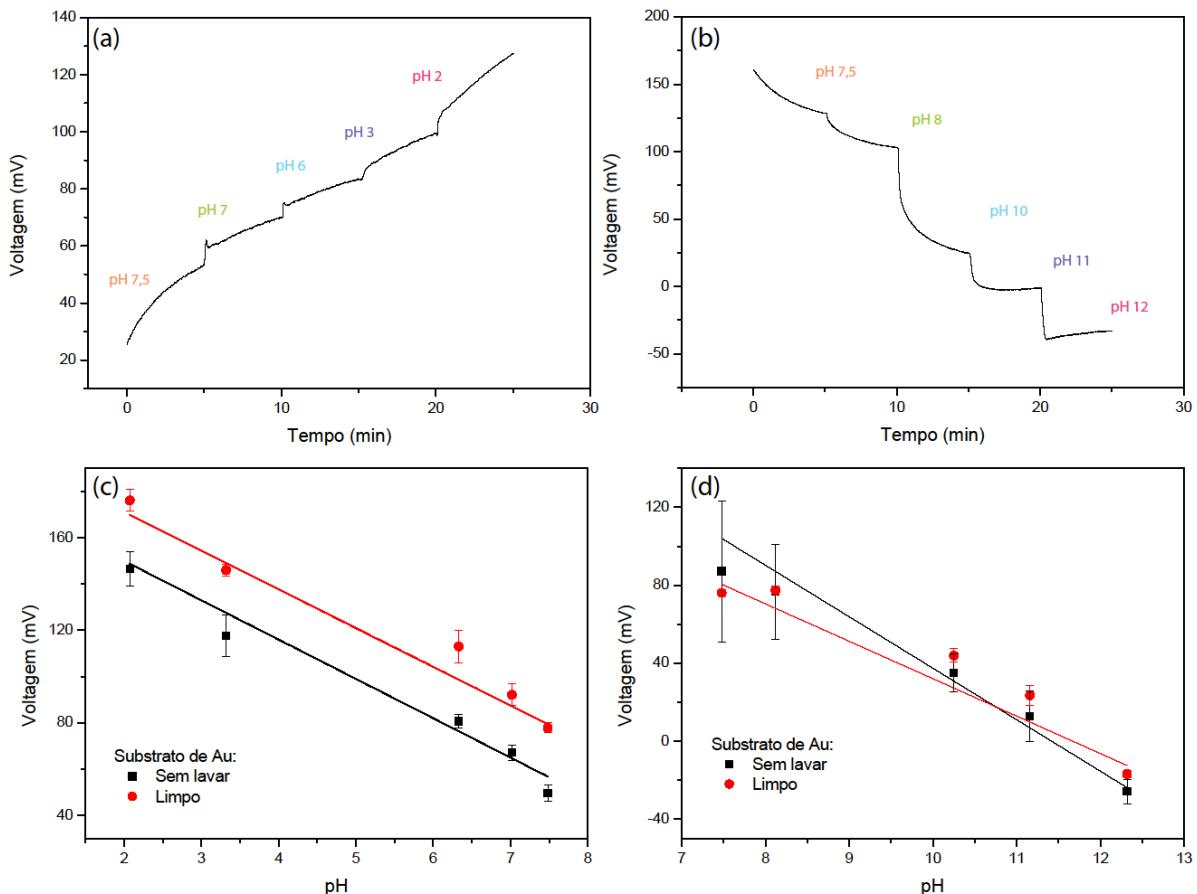


Figura 5.9 – Curvas demonstrativas Voltagem x Tempo da variação do pH para as regiões (a) ácida e (b) básica. Curvas da sensibilidade Voltagem x pH para as regiões (c) ácida e (d) básica, mostrando a diferença entre o uso de substratos antes e após o processo de limpeza.

Observa-se que no domínio da voltagem o tipo da curva obtida é o mesmo, já que estão relacionadas com as curvas obtidas medindo-se corrente apenas por uma constante (resistência do sistema). No entanto, se comparado ao SEGFET, observa-se uma maior estabilidade da medida ao utilizar o AI. Por exemplo, embora a redução no erro também ocorra após o processo de lavagem, o ajuste linear da curva não sofre grandes alterações.

Além disso, a região ácida apresenta apenas um deslocamento do valor de voltagem obtido, não havendo variação de sensibilidade, ou seja, apesar de uma medida mais acurada (redução do erro) o processo de lavagem não interferiu na sensibilidade do sistema, ou seja, a variabilidade entre as medidas realizadas com o AI são consideravelmente reduzidas se comparado ao SEGFET. O mesmo pode ser concluído observando-se os resultados para a região básica.

Tabela 5.2 – Dados das curvas referentes ao AI como sensor de pH para as regiões ácida e básica, utilizando substratos de Au antes e após a limpeza.

Parâmetros	pH_{ácido}		pH_{básico}	
	Sem lavar	Limpo	Sem lavar	Limpo
r^2	0.936	0.981	0.974	0.956
(a $\pm \Delta a$) (mV)	184 \pm 14	205 \pm 7	301 \pm 25	224 \pm 19
(b $\pm \Delta b$) (mV.pH ⁻¹)	-17 \pm 2	-17 \pm 1	-26 \pm 2	-19 \pm 2

Para os dados obtidos tanto na Tabela 5.1 quanto na Tabela 5.2 observa-se que os valores da sensibilidade ($b \pm \Delta b$) correspondem a de um material não-nernstiano, como esperado, embora o valor de 30 mV.pH⁻¹ não seja encontrado pelo fato de o experimento ter sido realizado em duas etapas. A construção da curva completa (pH 2 ao 12) proporcionaria um valor mais próximo do teórico, no entanto foram utilizados eletrodos diferentes, logo esta não é possível. No entanto, os valores de sensibilidade utilizando-se o AI aproxima-se de 20 mV.pH⁻¹, sendo um excelente resultado, considerando-se a cobertura de apenas uma região. Esta comparação direta não é possível para o SEGFET pois as medidas estão no domínio de corrente, logo, o resultado da sensibilidade de eletrodos de ouro, (-8.3 \pm 0.3) μ A.pH⁻¹ para região ácida e (-9.3 \pm 1.6) μ A.pH⁻¹ para região básica, considerando os eletrodos limpos, são inéditos na literatura, logo estes valores podem ser considerados como o esperado para o comportamento de eletrodos de ouro ao pH, sendo o correspondente no domínio de corrente a um comportamento não-nernstiano.

5.3 Imunossensores amperométricos para detecção de NS1

A partir da confirmação experimental da aplicação de um MOSFET na configuração SEGFET e de um AI operando na configuração de circuito aberto (OCP) como sensores de pH, é necessária a demonstração da aplicabilidade destes em imunossensores. Para isto, foi necessário a certificação de que o sistema proposto teoricamente como não-nernstiano é capaz de diferenciar alterações locais de carga que se encontram dentro do limite do comprimento de Debye. Para o tampão 0.01X PBS, que corresponde as concentrações listadas na Tabela 4.1 com um fator 100 de diluição, obtém-se o seguinte valor para λ_D , a partir do uso das Equações 3.17 e 3.18, considerando a constante dielétrica do solvente (água) de 80.1 (~25 °C):

$$I = \frac{1}{2} [150 mM \cdot 2 + 3mM \cdot 2 + 2 \cdot 10mM + 2^2 \cdot 10mM + 2 \cdot 10mM] \cdot 0.01 \quad (5.1)$$

$$I = 1.93 mM \quad (5.2)$$

$$\lambda_D = 0.304 / \sqrt{1.93 mM \cdot 10^{-3}} \quad (5.3)$$

$$\lambda_D = 6.9 nm \quad (5.4)$$

Para detectar a interação antígeno-anticorpo, a espessura da camada molecular imobilizada de anticorpo não pode exceder o valor do comprimento de Debye, que de acordo com a Equação 5.4 corresponde a 6.9 nm. Uma maneira de obter valores aproximados para o tamanho dos anticorpos é utilizar valores como o raio de Stokes-Einstein (R_H) ou o raio de giro (R_G). O primeiro é baseado no modelo de movimento de uma esfera com determinado raio de hidratação, através de um líquido viscoso (108). Note que este raio é ligeiramente diferente do raio efetivo de uma molécula hidratada em solução. Já R_G é um parâmetro obtido através de SAXS (Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo) que provém um valor mais acurado do raio efetivo da molécula (109). Como as imunoglobulinas não são proteínas esféricas, mas sim em forma de Y, há um erro associado nos valores de R_H , já que quanto mais estendidas sob um eixo, os valores de R_H são maiores se comparado a uma proteína de mesmo peso molecular, no entanto, são bons indicativos no que se refere a uma estimativa das dimensões das mesmas em relação às dimensões da dupla-camada (λ_D é composto pela dupla-camada e pela região de acumulação de íons do soluto).

Lembrando ainda que as moléculas utilizadas no processo de imobilização, como a cisteamina e o glutaraldeído são consideradas moléculas de comprimento zero (110), ou seja, estão dentre as menores moléculas existentes que se pode utilizar, logo não foi somado à R_H ou R_G , sendo seu valor considerado dentro da margem de erro destes.

Segundo Karlsson (111), o R_H da IgG de coelho é 5.2 nm, e dado a grande conservação das imunoglobulinas entre mamíferos (72), é correto presumir que este valor pode ser utilizado para representar o R_H da IgG de rato utilizada. Como $R_H < \lambda_D$, a carga do anticorpo estará totalmente neutralizada, no entanto há uma margem de quase 1 nm (considerando a camada de cisteamina e glutaraldeído) que permite a detecção da interação Ab-Ag. Para a IgY o valor de R_G é um pouco maior, 6.13 nm (112).

Além disso, o ponto isoelétrico (pI) da IgG se encontra no intervalo de pH [6.1 ; 8.5], ou seja, (7.3 ± 1.2) (113-114), um pouco acima do pI da IgY, que se encontra no intervalo de [5.7 , 7.6], ou seja (6.6 ± 0.9) (114). No entanto, o pI da proteína NS1 é 5.7 (115), ou seja, mesmo que a IgG e IgY estejam neutras em pH fisiológico (pH 7.4), o antígeno está negativamente carregado, induzindo cargas na camada de anticorpo imobilizada, favorecendo a detecção.

Por outro lado, a proteína NS1 tem um R_H de 6.44nm e um R_G de 5 nm (50). Estes valores foram calculados a partir de um oligômero de NS1, que é encontrada no meio extracelular na forma de um hexâmero. Assim, é correto supor que estes valores serão consideravelmente reduzidos ao se utilizar o monômero, logo pelo menos metade da carga do antígeno estará dentro da faixa de detecção. O ideal seria a inserção completa do antígeno na região determinada pelo comprimento de Debye.

É interessante observar que neste trabalho optou-se pela imobilização do anticorpo na plataforma e detecção da proteína NS1, no entanto, o oposto poderia ter sido realizado. Com a NS1 covalentemente ligada à plataforma, teríamos uma área maior disponível sensível à carga devido a uma distância maior entre R_G e λ_D , promovendo um sinal ainda maior. Porém, o foco neste caso é o desenvolvimento de um dispositivo capaz de detectar dengue nos primeiros dias de infecção. Deste modo, a configuração com o Ab imobilizado é a mais apropriada para nossos objetivos, embora a outra também tenha valor para detecção/monitoração da presença de anticorpos, podendo ser utilizado na diferenciação entre infecções primárias e secundárias. Através deste segundo sistema seria possível observar apenas a presença de anticorpos anti-dengue no organismo do paciente, indicando que houve contaminação, mas em um período, como visto na Figura 2.5, em que o paciente já se encontra curado da doença. Logo, do ponto de vista de diagnóstico, não seria eficiente, ao contrário do método escolhido, que promove a detecção direta da presença do vírus no organismo, até o 6º dia de infecção.

A resposta do imunossensor utilizando o MOSFET pode ser observada na Figura 5.10a através da variação da corrente I_{DS} com o tempo. Pode-se observar que há uma rápida estabilização desta corrente (cerca de 5 min). Em seguida foi adicionado o tampão 0.01X PBS com o objetivo de verificar o seu efeito na medida da corrente entre a fonte e o dreno. Vê-se que não há alteração desse sinal, de modo que a alteração de I_{DS} quando da adição de uma pequena alíquota ($0.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) da proteína NS1 pode ser atribuído à variação da carga na camada ativa do biossensor, sem influência dos íons presentes no tampão. A adição da proteína causa a redução do valor da corrente, assim como observado para adição de NaOH

nos testes de sensor de pH, ou seja, espera-se que a proteína esteja carregada negativamente, o que é consistente com o esperado, já que seu pI é 5.7 e a medida foi realizada em pH 7.4.

A Figura 5.10b apresenta a curva analítica construída a partir de medidas da variação dessa corrente, ΔI_{DS} , feita em triplicata para diversas concentrações. Observa-se que para concentrações menores que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a resposta do imunossensor não é muito específica. Isto ocorre porque as alterações de I_{DS} estão na ordem de $1 \mu\text{A}$, muito próximo da precisão do multímetro utilizado na medida. Assim, as concentrações nesta escala considerando-se a barra de erro não são diferenciáveis. No entanto, é importante ressaltar que o imunossensor é capaz de detectar a presença de NS1 na escala de nanomolar, embora não seja possível medir exatamente a concentração. Dado que a concentração mínima no sangue de pacientes infectados por dengue é cerca de $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o imunossensor é capaz de prover um resultado positivo mesmo nos casos mais brandos de infecção.

As concentrações medidas se encontram na parte linear da curva analítica, com uma inclinação de $(15.7 \pm 4.4) \cdot 10^{-4} \mu\text{A} \cdot \mu\text{g.mL}^{-1}$ e r^2 de 0.7. A curva apresenta um ajuste regular devido a discrepância entre as medidas para valores menores e maiores que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

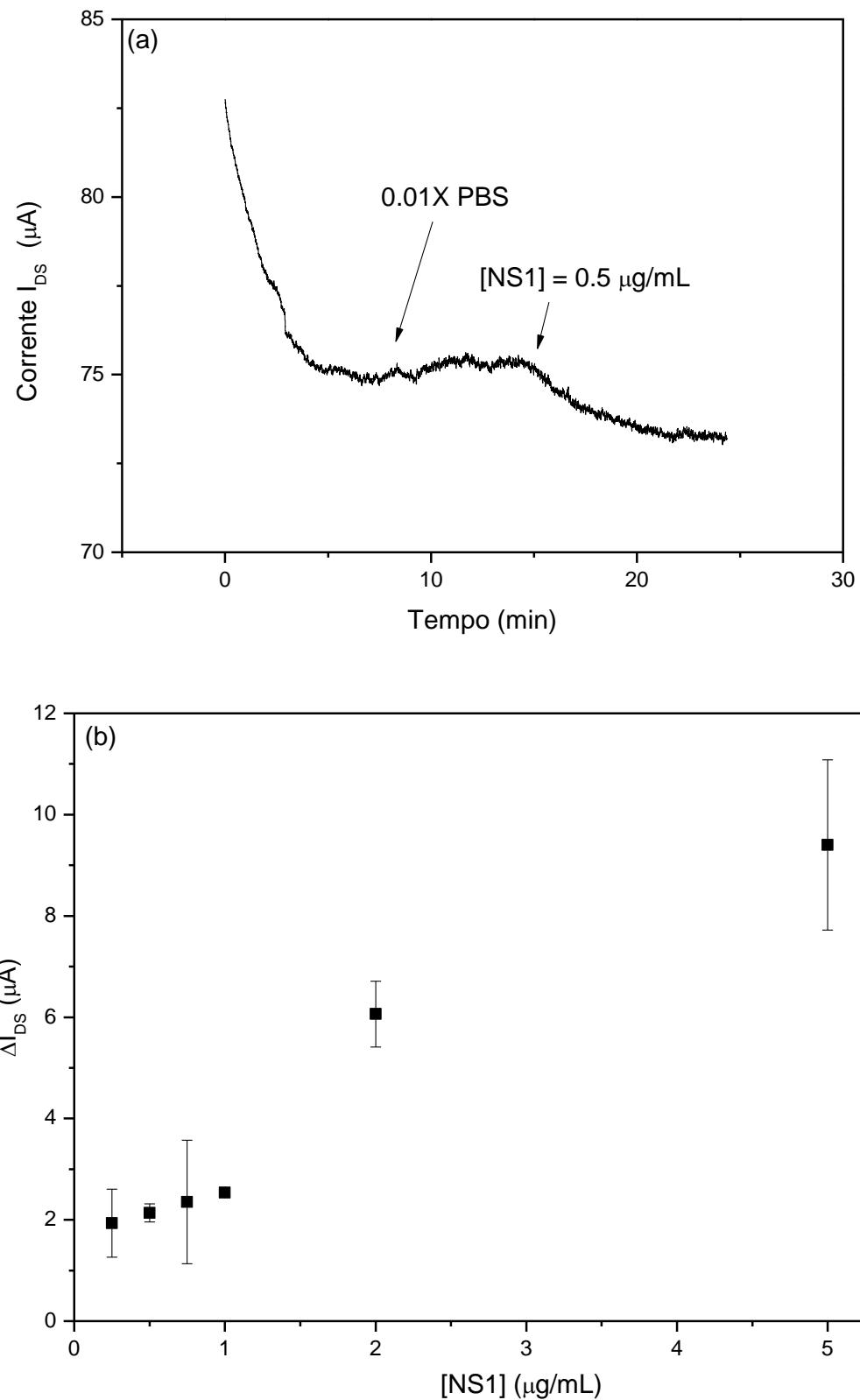


Figura 5.10 – (a) Resposta temporal da corrente I_{DS} à adição de $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína NS1 e (b) curva analítica.

5.4 Imunossensores voltanométricos para detecção de NS1

Devido à obtenção de resultados positivos na detecção de NS1 mesmo nas concentrações mais reduzidas possíveis no quadro de infecção, decidiu-se pela continuidade do projeto em conjunto com a empresa DNApta, com a ideia de miniaturização do dispositivo e posterior conjunto de testes em amostras de sangue real. Sendo assim, embora o ajuste da curva analítica para o MOSFET tenha sido regular, um dos objetivos principais desta dissertação foi concluído com esta etapa, partindo-se para otimização do imunossensor já no dispositivo proposto para miniaturização. Para isso foi levado em consideração a necessidade de um kit para detecção de dengue nos primeiros dias de infecção que fosse de baixo custo e apresentasse um diagnóstico rápido nos primeiros dias de infecção, que fosse utilizado por profissionais sem treinamento específico em postos de saúde em todo país, sem a necessidade de equipamentos caros e característicos de laboratórios de pesquisa. Aliado a isso há a necessidade de monitoração pelo governo não apenas dos casos suspeitos mas, principalmente, da ocorrência de casos graves e os óbitos decorridos destes.

A etapa de miniaturização considerou um novo eletrodo em conjunto com uma nova célula de medida, reduzindo o volume de 20 mL para 0.5 mL, ou seja, volume 40 vezes menor.

A nova célula de medida foi projetada e então fabricada em acrílico em colaboração com Wagner Rafael Correr, Especialista em Laboratório do Grupo Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do IFSC – USP. A Figura 5.11 mostra os detalhes do eletrodo e da célula em comparação com a célula usada originalmente no presente trabalho. Primeiramente, o eletrodo da esquerda na Figura 5.10a passou da cobertura completa do BK7 com Cr/Au para a delimitação da área de imobilização ($\sim 20 \text{ mm}^2$) e exposição de uma área reduzida específica para o contato. Para isso, foram construídas máscaras metálicas, com capacidade para 20 eletrodos cada uma, de modo que o eletrodo obtido após a metalização apresente o formato ilustrado.

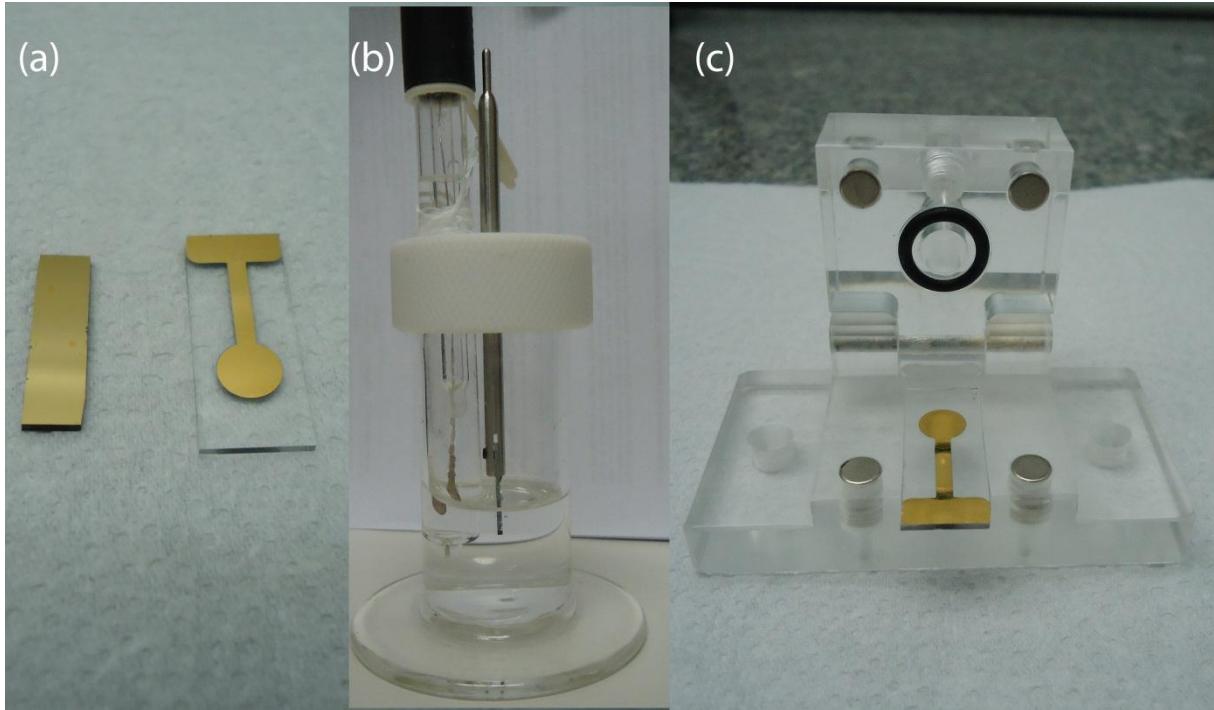


Figura 5.11 – (a) Eletrodos utilizados para imobilização do anticorpo, célula de medida (b) original e (c) fabricada na primeira etapa de miniaturização.

A Figura 5.11b mostra o esquema para realização das medidas antes do processo de miniaturização. Era utilizada uma célula fechada, com uma tampa de teflon com duas aberturas para encaixe do eletrodo de referência e do eletrodo de medida e uma para adição do antígeno. O volume a ser utilizado pode ser variado, tendo-se escolhido como padrão para os experimentos 20 mL. Em contrapartida, a célula apresentada na Figura 5.11c comporta o volume máximo de 500 μ L e possui uma facilidade de manuseio bem maior. O eletrodo é encaixado na parte inferior e fixado na parte superior do compartimento da solução tampão por um anel de borracha (O-ring). Em seguida a célula é fechada, sendo vedada com o auxílio de 4 ímãs. A solução tampão é inserida por uma abertura superior, onde é encaixado o eletrodo de referência. O antígeno é adicionado após a estabilização por uma pequena abertura lateral ao eletrodo de referência.

Aliado a redução do volume da célula de medida, foi realizada a troca do dispositivo transdutor de sinal. O MOSFET CD4007UB foi trocado pelo AI INA 111, alterando as medidas do domínio de corrente para o domínio de tensão. O AI apresenta uma maior estabilidade de sinal devido a ordem de grandeza do sinal de voltagem, 10^3 vezes maior que o sinal de corrente. O sinal do eletrodo é ligado à entrada não inversora do AI, trabalhando como seguidor de tensão (ver Figura 4.6). Além disso, não há necessidade do uso de uma fonte variável de tensão, apenas da aplicação de uma tensão constante proveniente, por exemplo, de uma bateria de 9V.

O bloqueio no processo de imobilização também foi alterado nesta etapa. A BSA foi substituída pela etanolamina, uma molécula igualmente eficiente para cobertura dos sítios de ligação expostos remanescentes, com a vantagem do seu tamanho reduzido, se comparado a uma proteína. Assim, a superfície do imunossensor fica menos congestionada, ou seja, há mais espaço livre entre dois anticorpos ligados, aumentando também a probabilidade de ligação de um antígeno e sua maior aproximação da superfície do sensor.

A Figura 5.12a ilustra o sinal do AI obtido após a estabilização e da adição de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NS1. No entanto, é clara a maior estabilidade do sinal nesse caso. Devido ao volume muito reduzido, nota-se a presença de um pico logo após a adição de NS1, que aparece devido a perturbação do sistema, mas observa-se que o valor decai ao valor de estabilização até cerca de 2 min após a adição, de modo que os valores utilizados para a variação da voltagem, ΔV , correspondem ao valor do patamar do primeiro patamar de estabilização menos o valor da segunda estabilização que corresponde ao mínimo da curva de adição.

A Figura 5.10b mostra a dependência da variação da voltagem, ΔV , com a concentração de NS1 considerando para cada ponto a realização de medidas em triplicata. Novamente, as concentrações medidas se encontram na parte linear da curva analítica, que mostrou com um coeficiente angular de $(3.2 \pm 0.3) \text{ mV}.\mu\text{g.mL}^{-1}$ para um coeficiente de confidência r^2 de 0.96. A curva apresenta um ajuste muito melhor se comparado às medidas realizadas com o MOSFET, para um intervalo semelhante de concentração. Além disso, a resposta do sensor é muito mais sensível na região de concentrações 0.5 e 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Isto comprova que a alteração no dispositivo de transdução foi bem sucedida, promovendo significante melhora não apenas na qualidade do sinal, mas também na amplitude do mesmo e a plataforma apresenta uma concordância superior entre as medidas para uma mesma concentração, ou seja, há uma reproduzibilidade maior, observada na redução do erro individual. A troca da célula de medida também obteve sucesso, promovendo um isolamento maior do sistema, reduzindo o contato entre a pessoa operadora com a solução de medida.

Devido as restrições de detecção impostas pelo λ_D , não é possível na constituição atual realizar a detecção direta do soro humano, devido à sua elevada concentração salina, equivalente a do tampão 1X PBS, que apresenta um λ_D de apenas 0.7 nm, insuficiente para medida. Para se adequar a estas condições, foi utilizado o tampão 100 vezes diluído, de modo que os testes com interferentes também foram realizados utilizando-se a concentração do interferente no sangue com o fator 100 de diluição.

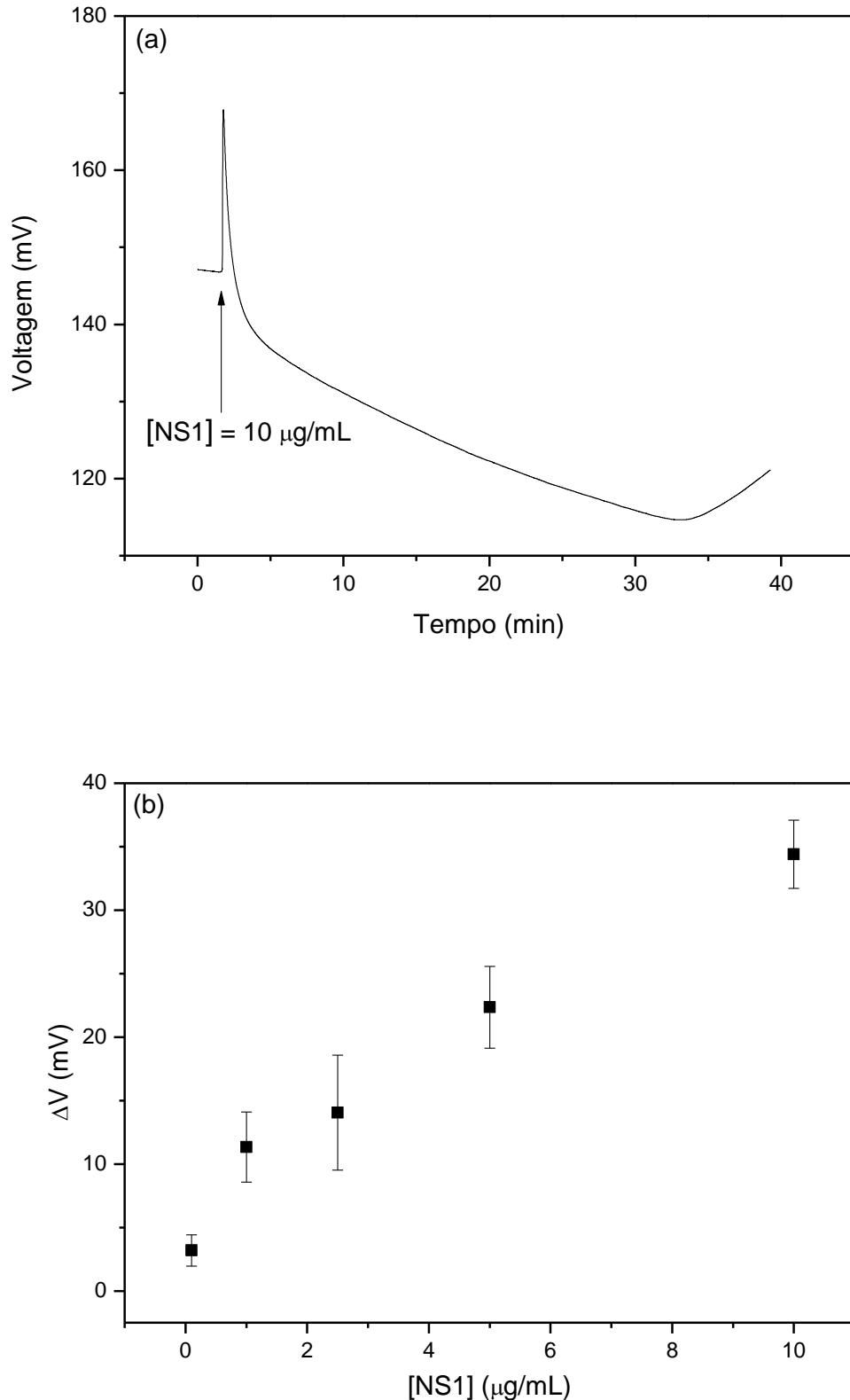


Figura 5.12 – (a) Resposta temporal da adição de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína NS1 e (b) curva analítica .

Foram escolhidos como interferentes alguns componentes comumente presentes no soro humano, como glicose e HSA, nas concentrações de 0.01 mg.mL^{-1} e 0.45 mg.mL^{-1} , respectivamente. Devido à similaridade e aproximado peso molecular ($\text{MM}_{\text{HSA}} = 67 \text{ kDa}$ e $\text{MM}_{\text{BSA}} = 66.5 \text{ kDa}$), utilizou-se BSA no lugar de HSA. É um comparativo interessante com a própria NS1, já que apresentam tamanhos parecidos. Além disso, o próprio soro não contaminado foi testado na diluição 1:100, com o objetivo de observar a resposta do imunossensor frente à uma amostra real.

A Figura 5.13 apresenta o sinal correspondente à resposta do imunossensor valtanométrico após as sucessivas adições de interferentes (curva superior). O sinal contendo a resposta ao NS1 é apresentado para efeito comparação (curva inferior). Observa-se que a resposta aos interferentes é nitidamente menor que à resposta ao NS1. O pico devido à interferência no sistema está presente nos casos de adição de BSA e de soro, mas não de glicose, o que acontece devido ao tamanho reduzido da glicose frente à BSA e os componentes do soro. Embora pequenas alterações de sinal sejam observadas em todos os casos, a maior variação pico a pico, tomando-se como base o valor de estabilização de 250 mV, é de 1.5 mV. Comparado ao ΔV de aproximadamente 38 mV para adição de $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NS1, conclui-se que o sinal obtido quando da adição da proteína de interesse é bem mais relevante. Pode-se concluir que o imunossensor construído apresenta baixa sensibilidade a moléculas que não à NS1, apresentando, portanto, uma elevada especificidade no que diz respeito à essa molécula. Espera-se que seja possível diferenciar o soro contaminado do soro não contaminado na diluição 1:100, no entanto estes experimentos não foram realizados devido à necessidade de um laboratório com nível de segurança 2.

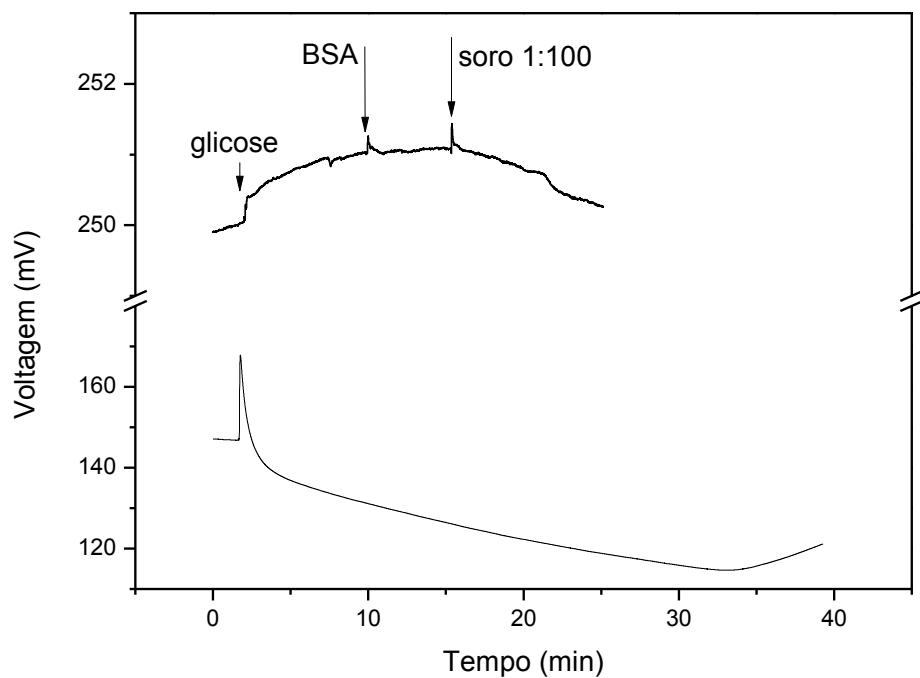


Figura 5.13 – Resposta do imunossensor à adição de interferentes (curva superior) e à adição da NS1 para efeito de comparação. A escala das ordenadas foi dividida para salientar os efeitos na resposta.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta dissertação foram construídos imunossensores com anticorpos anti-proteína NS1 do vírus da dengue, com o objetivo de diagnóstico nos primeiros dias de infecção em colaboração com a empresa DNApta de São José do Rio Preto.

Foram propostas duas plataformas: a primeira utilizando um MOSFET (CD4007UB) com o objetivo primário de observar a possibilidade de detecção de NS1 e confecção de curva analítica. O sucesso desta etapa levou ao prosseguimento do projeto a partir da troca do dispositivo transdutor para um AI (INA 111), no qual foi realizada otimização do procedimento de medida e nova curva analítica.

A caracterização da membrana sensível foi realizada utilizando-se diversos tipos de microscopia com as quais foi possível observar: o efeito do procedimento de limpeza com MEV, o sucesso no procedimento de imobilização do anticorpo através de AFM e LSCM, sendo que nesta última ainda foi possível discernir o padrão de imobilização das moléculas e ainda o uso de EIS, na qual a análise da alteração da impedância passo-a-passo na imobilização mostra o comportamento da dupla camada conforme a modificação da superfície.

O estudo dos eletrodos de ouro como sensor de pH foram bem sucedidos, mostrando ainda o efeito do procedimento de limpeza sobre a sensibilidade, obtendo-se, como esperado, uma sensibilidade não-nernstiana, necessária para aplicação em imunossensores baseados em FETs.

A aplicação da plataforma na detecção da proteína NS1 foi realizada com sucesso, sendo possível detectar tanto no SEGFET quanto com o AI concentrações da ordem de ng.mL^{-1} , dentro da faixa de concentrações presentes em organismos detectados, mostrando o potencial para utilização no diagnóstico precoce da doença.

Foram obtidas sensibilidade de $(15.7 \pm 4.4) \cdot 10^4 \mu\text{A}.\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o SEGFET e $(3.2 \pm 0.3) \text{ mV}.\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o AI. Embora a comparação direta não seja possível devido as medidas serem de natureza diferente (corrente e tensão), observou-se significante melhora do sinal e do ajuste da curva analítica com a utilização do AI.

Devido a colaboração com a empresa DNApta, houve interesse desde o início em desenvolver o dispositivo de maneira que possa ser comercializado e utilizado em postos de saúde de todo o país como fonte de diagnóstico rápido e barato para dengue. Assim, foi

realizado o pedido de patente das plataformas, que se encontra atualmente em trâmite pela USP Inovação.

Paralelamente, foram realizados trabalhos de espectroscopia de impedância voltados também para o diagnóstico de dengue, sensores de pH (19, 116) e biossensores de glicose (18) e uréia (117) no sistema SEGFET (a serem) publicados em revistas científicas.

Finalmente, espera-se que o presente trabalho possa contribuir para o desenvolvimento da ciência no país, através do desenvolvimento de um dispositivo de diagnóstico que possa ser comercializado, cuja pesquisa continua em nosso grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

1 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SÁUDE. 2013. Disponível em:< <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 24/04/2013.

2 DENGUE: Informações gerais. 2013. Disponível em: < www.saude.gov.br/>. Acesso em: 24/04/2013.

3 SAÚDE estadual contabiliza 11 mortes confirmadas por dengue em MT. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mato-grosso/noticia/2013/03/saude-estadual-contabiliza-11-mortes-confirmadas-por-dengue-em-mt.html?>>. Acesso em: 26/03/2013.

4 CASOS de dengue crescem 75% no Distrito Federal. 2013. Disponível em: <<http://ultimosegundo.ig.com.br/brasil/2013-03-21/casos-de-dengue-crescem-75-no-distrito-federal.html>>. Acesso em: 26/03/2013.

5 CASOS de dengue confirmados em 2013 já superam em 20% o total de 2012. 2013. Disponível em: <<http://zerohora.clicrbs.com.br/rs/geral/noticia/2013/03/casos-de-dengue-confirmados-em-2013-ja-superam-em-20-o-total-de-2012-4080532.html>>. Acesso em: 26/03/2013.

6 REGIONAL Nordeste é a mais afetada pela dengue em Belo Horizonte. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/minas-gerais/noticia/2013/04/regional-nordeste-e-mais-afetada-pela-dengue-em-belo-horizonte.html>>. Acesso em: 24/04/2013.

7 MINAS Gerais tem mais de 64 mil casos de dengue em 2013. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/minas-gerais/noticia/2013/04/minas-gerais-tem-mais-de-64-mil-casos-de-dengue-em-2013.html>>. Acesso em: 24/04/2013.

8 DIRETRIZES Nacionais para Prevenção e controle de Epidemias de Dengue. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue_11_02_10.pdf>. Acesso em: 24/04/2013.

9 NGUYEN, B. T. T.; PEH, A. E. K.; CHEE, C. Y. L.; FINK, K.; CHOW, V. T. K.; NG, M. M. L.; TOH, C.S. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry*, v. 88, p. 15-21, 2012. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2012.04.006

10 PEH, A. E. K.; LI, S. F. Y. Dengue virus detection using impedance measured across nanoporous aluminamembrane. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 42, p. 391-396, 2013. DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.054.

- 11 NUNES, M. R. T.; NUNES NETO, J. P. N.; CASSEB, S. M. M.; NUNES, K. N. B.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; CASSEB, L. M. N.; VASCONCELOS, P. F. C. Evaluation of an immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of dengue infection. *Journal of Virological Methods*, v. 171, n.1, p. 13-20, 2011.
- 12 KUMBHAT, S.; SHARMA, K.; GEHLOT, R.; SOLANKI, A.; JOSHI, V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, n.2, p. 255-259, 2010.
- 13 DIAS, A. C. M. S.; GOMES-FILHO, S. L. R.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 44, n.0, p. 216-221, 2013.
- 14 LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n.8, p. 1165-1168, 2002.
- 15 PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. S30-S37, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2459
- 16 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 33, n.15, p. 1-26, 2002.
- 17 ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. New York: Academic Press, 2008.
- 18 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Self-assembled films of dendrimers and metallophthalocyanines as fet-based glucose biosensors. *Sensors*, v. 11, n.10, p. 9442-9449, 2011.
- 19 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; FACETO, A. D.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Dendrimers/TiO₂ nanoparticles layer-by-layer films as extended gate FET for pH detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 169, p. 397-400, 2012. DOI: 10.1016/j.snb.2012.01.003.
- 20 VIEIRA, N.; FERNANDES, E. G.; FACETO, A. D.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. Nanostructured polyaniline thin films as pH sensing membranes in FET-based devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 160, n.1, p. 312-317, 2011

- 21 MAO, K.; WU, D.; LI, Y.; MA, H.; NI, Z.; YU, H.; LUO, C.; WEI, Q.; DU, B. Label-free electrochemical immunosensor based on graphene/methylene blue nanocomposite. *Analytical biochemistry*, v. 422, n.1, p. 22-27, 2012.
- 22 SÁNCHEZ-POMALES, G.; ZANGMEISTER, R. A. Recent advances in electrochemical glycobiosensing. *International Journal of Electrochemistry*, v. 2011, p. 1-11, 2011. DOI:10.4061/2011/825790.
- 23 SOUZA, E.; NASCIMENTO, G.; SANTANA, N.; FERREIRA, D.; LIMA, M.; NATIVIDADE, E.; MARTINS, D.; LIMA-FILHO, J. Label-Free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. *Sensors*, v. 11, n.6, p. 5616-5629, 2011.
- 24 MARQUETTE, C. A.; BLUM, L. J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n.8, p. 1424-1433, 2006.
- 25 ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n.2, p. 376-381, 2002.
- 26 WIRDE, M.; GELIUS, U.; NYHOLM, L. Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltammetry. *Langmuir*, v. 15, n.19, p. 6370-6378, 1999.
- 27 BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY: what happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 88, n.1, p. 1-20, 2003.
- 28 SCHASFOORT, R.; BERGVELD, P.; KOOYMAN, R.; GREVE, J. Possibilities and limitations of direct detection of protein charges by means of an immunological field-effect transistor. *Analytica Chimica Acta*, v. 238, p. 323-329, 1990.
- 29 INFECTUOUS diseases: Dengue. 2003. Disponível em: <http://www.defence.gov.au/health/infocentre/journals/ADFHJ_sep03/ADFHealth_4_2_66-71.pdf>. Acesso em: 24/04/2013.
- 30 GUBLER, D. J.; KUNO, G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: Academic Press, 1997.
- 31 CATÃO, R. D. C. *Dengue no Brasil*: abordagem geográfica na escala nacional. São Paulo: Editora UNESP, 2011.

- 32 AEDES aegypti. 2013. Disponível em:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aedes_aegypti_feeding.jpg. Acesso em: 27/03/2013.
- 33 SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 102, n.6, p. 1042-1049, 2009.
- 34 SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; VAN VINH CHAU, N.; WILLS, B. Dengue. *New England Journal of Medicine*, v. 366, n.15, p. 1423-1432, 2012.
- 35 YAMADA, K.-I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology*, v. 24, n.3, p. 203-209, 2002.
- 36 LAM, S. K.; DEVINE, P. L. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clinical and Diagnostic Virology*, v. 10, n.1, p. 75-81, 1998.
- 37 HUHTAMO, E.; HASU, E.; UZCÁTEGUI, N. Y.;ERRA, E.; NIKKARI, S.; KANTELE, A.; VAPALAHTI, O.; PIIPARINEN, H. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology*, v. 47, n.1, p. 49-53, 2010.
- 38 BARKHAM, T. M.; CHUNG, Y. K.; TANG, K. F.; OOI, E. E. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n.2, p. 142-148, 2006.
- 39 LODISH, H. *Biologia celular e molecular*. New York: Academic Press, 2005
- 40 LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n.3, p. 545-551, 1992.
- 41 GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 8, n.2, p. 69-80, 2004.
- 42 TELES, F. S. R. R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 687, n.1, p. 28-42, 2011.
- 43 ACHESON, N. H. *Fundamentals of molecular virology*. New York: Academic Press, 2007.

44 PROTEIN Data Bank. 2013. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 24/04/2013.

45 PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, n.4, p. 369-377, 2008.

46 RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n.16, p. 2773-2786, 2010.

47 ZHANG, X.; GE, P.; YU, X.; BRANNAN, J. M.; BI, G.; ZHANG, Q.; SCHEIN, S.; ZHOU, Z. H. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 20, n. 1, p. 105-110, 2012.

48 INSTITUTO OSVALDO CRUZ – FIOCRUZ. *Dengue - topics in international health*. Rio de Janeiro: 2009. CD-Rom.

49 NOISAKRAN, S.; DECHTAWEWAT, T.; RINKAEWKAN, P.; PUTTIKHUNT, C.; KANJANAHALUETHAI, A.; KASINRERK, W.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *Journal of Virological Methods*, v. 142, n.1, p. 67-80, 2007.

50 FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F. A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, v. 73, n.7, p. 6104-6110, 1999.

51 KUMARASAMY, V.; WAHAB, A. H. A.; CHUA, S. K.; HASSAN, Z.; CHEM, Y. K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K. B. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *Journal of Virological Methods*, v. 140, n.1–2, p. 75-79, 2007.

52 SCHÖNING, M. J.; POGHOSSIAN, A. Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). *Analyst*, v. 127, n.9, p. 1137-1151, 2002.

53 WILSON, G. S.; THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, n. 1, p. 121-131, 2001.

54 ZHANG, G.-J.; HUANG, M. J.; LUO, Z. H. H.; TAY, G. K. I.; LIM, E.-J. A.; LIU, E. T.; THOMSEN, J. S. Highly sensitive and reversible silicon nanowire biosensor to study nuclear hormone receptor protein and response element DNA interactions. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n.2, p. 365-370, 2010.

55 TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA biosensors. *Talanta*, v. 77, n.2, p. 606-623, 2008.

56 BETTAIEB, F.; PONSONNET, L.; LEJEUNE, P.; OUADA, H. B.; MARTELET, C.; BAKHROUF, A.; JAFFRÉZIC-RENAULT, N.; OTHMANE, A. Immobilization of *E. coli* bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design. *Bioelectrochemistry*, v. 71, n.2, p. 118-125, 2007.

57 HOLFORD, T. R.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 34, n. 1, p. 12-24, 2011.

58 YANG, J.; WANG, X.; SHI, H. An electrochemical DNA biosensor for highly sensitive detection of phosphinothricin acetyltransferase gene sequence based on polyaniline-(mesoporous nanozirconia)/poly-tyrosine film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 162, n.1, p. 178-183, 2012.

59 LIU, Q.; HU, N.; ZHANG, F.; WANG, H.; YE, W.; WANG, P. Neurosecretory cell-based biosensor: monitoring secretion of adrenal chromaffin cells by local extracellular acidification using light-addressable potentiometric sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 35, n.1, p. 421-424, 2012

60 RAHIM RUSLINDA, A.; TANABE, K.; IBORI, S.; WANG, X.; KAWARADA, H. Effects of diamond-FET-based RNA aptamer sensing for detection of real sample of HIV-1 Tat protein. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 40, n.1, p. 277-282, 2013.

61 LIU, X.; LIN, P.; YAN, X.; KANG, Z.; ZHAO, Y.; LEI, Y.; LI, C.; DU, H.; ZHANG, Y. Enzyme-coated single ZnO nanowire FET biosensor for detection of uric acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 176, n.0, p. 22-27, 2013.

62 ELTZOV, E.; PAVLUCHKOV, V.; BURSTIN, M.; MARKS, R. S. Creation of a fiber optic based biosensor for air toxicity monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 155, n.2, p. 859-867, 2011.

63 SAI, V. V. R.; KUNDU, T.; DESHMUKH, C.; TITUS, S.; KUMAR, P.; MUKHERJI, S. Label-free fiber optic biosensor based on evanescent wave absorbance at 280 nm. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 143, n.2, p. 724-730, 2010.

64 JEON, B. J.; KIM, M.H.; PYUN, J.C. Application of a functionalized parylene film as a linker layer of SPR biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 154, n.2, p. 89-95, 2011.

65 DU, L.; WU, C.; PENG, H.; ZOU, L.; ZHAO, L.; HUANG, L.; WANG, P. Piezoelectric olfactory receptor biosensor prepared by aptamer-assisted immobilization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012.In press. DOI:10.1016/j.snb.2013.02.009.

66 BABACAN, S.; PIVARNIK, P.; LETCHER, S.; RAND, A. G. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 15, n.11–12, p. 615-621, 2000.

- 67 LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 37, n.0, p. 101-111, 2012.
- 68 BERGVELD, P.; SIBBALD, A., *Analytical and biomedical applications of ion-selective field-effect transistors*. New York: Academic Press, 1988.
- 69 STARODUB, N.; DZANTIEV, B.; STARODUB, V.; ZHERDEV, A. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor. *Analytica Chimica Acta*, v. 424, n.1, p. 37-43, 2000.
- 70 ENGSTRÖM, H. A.; ANDERSSON, P. O.; OHLSON, S. A label-free continuous total-internal-reflection-fluorescence-based immunosensor. *Analytical Biochemistry*, v. 357, n.2, p. 159-166, 2006.
- 71 LIN, J.; WEI, Z.; CHU, P. A label-free immunosensor by controlled fabrication of monoclonal antibodies and gold nanoparticles inside the mesopores. *Analytical Biochemistry*, v. 421, n.1, p. 97-102, 2012.
- 72 DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. *Roitt's essential immunology*. New York: Wiley-Blackwell, 2011.
- 73 DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 135, n.3, p. 173-180, 2010.
- 74 SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, v.40, n. 5, p.313-322, 2012
- 75 TRESSLER, R. L.; ROTH, T. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n.32, p. 15406-15412, 1987.
- 76 KURTINAITIENE, B.; AMBROZAITE, D.; LAURINAVICIUS, V.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n.10, p. 1547-1554, 2008.
- 77 PIVIDORI, M. I.; LERMO, A.; BONANNI, A.; ALEGRET, S.; DEL VALLE, M. Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease. *Analytical Biochemistry*, v. 388, n.2, p. 229-234, 2009.

- 78 MARTINO, J. A.; PAVANELLO, M. A.; VERDONCK, P. B. *Caracterização elétrica de tecnologia e dispositivos MOS*. São Paulo: Ed. Thomson Learning, 2003.
- 79 MISHRA, U.; SINGH, J. *Semiconductor device physics and design*. Dordrecht: Springer Publishing Company, 2007.
- 80 BERGVELD, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v.17, n.1, p. 70-71, 1970.
- 81 LAUKS, I.; CHAN, P.; BABIC, D. The extended gate chemically sensitive field effect transistor as multi-species microprobe. *Sensors and Actuators*, v. 4, p. 291-298, 1983.
- 82 CHI, L.L.; CHOU, J.C.; CHUNG, W.Y.; SUN, T.P.; HSIUNG, S.K. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. *Materials Chemistry and Physics*, v. 63, n.1, p. 19-23, 2000.
- 83 ESTRELA, P.; PAUL, D.; LI, P.; KEIGHLEY, S. D.; MIGLIORATO, P.; LAURENSEN, S.; FERRIGNO, P. K. Label-free detection of protein interactions with peptide aptamers by open circuit potential measurement. *Electrochimica Acta*, v. 53, n.22, p. 6489-6496, 2008.
- 84 YATES, D. E.; LEVINE, S.; HEALY, T. W. Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface. *Journal Chemical Society Faraday Transactions 1*, v. 70, p. 1807-1818, 1974.
- 85 FUNG, C. D.; CHEUNG, P. W.; KO, W. H. A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 33, n.1, p. 8-18, 1986.
- 86 LYKLEMA, J. *Fundamentals of interface and colloid science: solid liquid interfaces*. New York: Academic Press, 2005.v.2.
- 87 ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and surface forces*. 3nd ed. New York: Academic Press, 2011.
- 88 FOGOLARI, F.; ZUCCATO, P.; ESPOSITO, G.; VIGLINO, P. Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann equation. *Biophysical journal*, v. 76, n.1, p. 1-16, 1999.
- 89 FOGOLARI, F.; BRIGO, A.; MOLINARI, H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *Journal of Molecular Recognition*, v. 15, n.6, p. 377-392, 2002.
- 90 BERGVELD, P.; VAN HAL, R.; EIJKEL, J. The remarkable similarity between the acid-base properties

of ISFETs and proteins and the consequences for the design of ISFET biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 10, n.5, p. 405-414, 1995.

91 VIEIRA, N. C. S. *Sensores e biosensores baseados em transistores de efeito de campo utilizando filmes automontados nanoestruturados*. 2011. 120p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

92 ABCAM. 2013 Disponível em: <<http://www.abcam.com/>>. Acesso em: 24/04/2013.

93 SIGMA-ALDRICH. 2013. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 24/04/2013.

94 STERN, E. *Label-free sensing with semiconducting nanowires*. London:Yale University Press,2007.

95 FISCHER, L. M.; TENJE, M.; HEISKANEN, A. R.; MASUDA, N.; CASTILLO, J.; BENTIEN, A.; ÉMNEUS, J.; JAKOBSEN, M. H.; BOISEN, A. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, v. 86, n.4, p. 1282-1285, 2009.

96 TEXAS INSTRUMENTS. *CD4007UB*. 2013. Disponível em: <<http://www.ti.com/product/cd4007ub>>. Acesso em: 24/04/2013.

97 TEXAS INSTRUMENTS. *INA 111*. 2013. Disponível em: <<http://www.ti.com/lit/ds/symlink/ina111.pdf>>. Acesso em: 24/04/2013.

98 BORGES, C. A. M. *Efeitos de interface sobre as propriedades ópticas de polímeros conjugados* . 2005. 142p. Tese(Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.São Carlos,2005.

99 COX, G. Biological confocal microscopy. *Materials Today*, v. 5, n. 3, p. 34-41, 2002.

100 SIGMA ALDRICH. *Fluorescein Isothiocyanate*. 2013. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f4274pis.Par_0001.File.tmp/f4274pis.pdf>. Acesso em: 24/04/2013.

101 MATHEIS, W.; SCHADE, R. Development of an IgY-based rocket-immunolectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *Journal of Immunological Methods*, v. 369, n.1–2, p. 125-132, 2011.

102 SCIENTIFIC, T. *Extinction Coefficients*. 2008. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/files/TR0006-Extinction-coefficients.pdf>>. Acesso em: 02/04/2013.

- 103 FANG, X.; TAN, O. K.; GAN, Y. Y.; TSE, M. S. Novel immunosensor platform based on inorganic barium strontium titanate film for human IgG detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 149, n.2, p. 381-388, 2010.
- 104 CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R. J. *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 20, n. 1, p. 10-26, 2009.
- 105 POGOSSIAN, A.; CHERSTVY, A.; INGEBRANDT, S.; OFFENHÄUSSER, A.; SCHÖNING, M. Possibilities and limitations of label-free detection of DNA hybridization with field-effect-based devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 111, p. 470-480, 2005. DOI: 10.1016/j.snb.2005.03.083
- 106 MARTINHON, P. T.; CARREÑO, J.; SOUSA, C. R.; BARCIA, O. E.; MATTOS, O. R. Electrochemical impedance spectroscopy of lead (II) ion-selective solid-state membranes. *Electrochimica Acta*, v. 51, n.15, p. 3022-3028, 2006.
- 107 FERREIRA, A.; FUGIVARA, C.; BARROZO, S.; SUEGAMA, P.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 634, n.2, p. 111-122, 2009.
- 108 VOROTYNTSEV, M. A.; ZINOVYEVA, V. A.; PICQUET, M. Diffusional transport in ionic liquids: Stokes–Einstein relation or “sliding sphere” model? Ferrocene (Fc) in imidazolium liquids. *Electrochimica Acta*, v. 55, n.18, p. 5063-5070, 2010.
- 109 PERRY, J. J. P.; TAINER, J. A. Developing advanced X-ray scattering methods combined with crystallography and computation. *Methods*, v. 59, n.3, p. 363-371, 2013.
- 110 HERMANSON, G. T. *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press, 1996.
- 111 CLAUSS, M. A.; JAIN, R. K. Interstitial transport of rabbit and sheep antibodies in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research*, v. 50, n.12, p. 3487-3492, 1990.
- 112 CSER, L.; GLADKIH, I. A.; HÄDGE, D.; AMBROSIUS, H. X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunology Letters*, v. 4, n.1, p. 15-19, 1982.
- 113 KARLSSON, D.; ZACCHI, G.; AXELSSON, A. Electronic speckle pattern interferometry: a tool for determining diffusion and partition coefficients for proteins in gels. *Biotechnology Progress*, v. 18, n.6, p. 1423-1430, 2002.

- 114 DÁVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; HIDALGO-ÁLVAREZ, R. Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 20, n.2, p. 165-175, 2001.
- 115 BLETHLY, C. *Antigenic and structural analysis of the NS1 glycoprotein of dengue virus*. 2002. 199p. Ph.D.(Doctor of Philosophy) - University of Queensland , Australia,2002.
- 116 VIEIRA, N.; AVANSI, W.; FIGUEIREDO, A.; RIBEIRO, C.; MASTELARO, V.; GUIMARAES, F. Ion-sensing properties of 1D vanadium pentoxide nanostructures. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, n.1, p. 310-314, 2012.
- 117 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; FERNANDES, E. G. R.; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTO, V. Nanostructured polyaniline thin films as urea-sensing membranes in field-effect devices. *Synthetic Metals*, v. 175, p. 108-111, 2013. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.05.005.