



**Tiago Carvalho Monteiro**

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

**Imunobiossensores capacitivos  
interdigitais com camadas sensíveis micro  
e nano-estruturadas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Ricardo Franco, Professor Auxiliar, REQUIMTE,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientador: Rui Igreja, Professor Auxiliar, CENIMAT,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientador: Pedro Sanguino, Investigador em pós-  
doutoramento, REQUIMTE, Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel R. Viana Baptista

Arguente: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro de 2013**

## **Direitos de Cópia**

### **Imunobiossensores capacitivos interdigitais com camadas sensíveis micro e nano-estruturadas**

Indicação dos direitos de cópia em nome de Tiago Carvalho Monteiro, aluno n.º 36454 do Mestrado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, referente à dissertação com o título “Imunobiossensores capacitivos interdigitais com camadas sensíveis micro e nano-estruturadas”.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Começo por agradecer ao Professor Doutor Ricardo Franco por me ter acolhido no seu laboratório e pela orientação que me deu na realização deste trabalho.

Um agradecimento ao Professor Doutor Rui Igreja por me ter concedido a oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho no seu laboratório e igualmente pela orientação dada.

A todos os que me acompanharam no laboratório 603 (*Nanobiotechnology*), Isabel Silva, João Luz, Inês Osório, Leonor Ricardo, Inês Gomes e Carlos Salazar, um muito obrigado por todo o apoio, espírito, ânimo, café e M&M's. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.

Ao Doutor Pedro Sanguino, um forte agradecimento pelas inúmeras horas de trabalho em conjunto e apoio dado ao longo deste ano.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, Miguel Fernandes, Tiago Dias, Marisa Silva, Cristiana Morais, Inês Pedras, Duarte Martins, José Silva, Tomás Calmeiro e Luís Antunes, um obrigado por os momentos passados nestes dois últimos anos.

E para os meus amigos e família do mundo académico, em especial ao Valter Fernandes, Tiago Pedreira, André Gonçalves, Aristides Mendes, Tânia Santos e Ricardo Morgado, sai um fortíssimo grito académico FRA!

Ao Núcleo de Tiro com Arco, malta da folia, em especial ao Nuno Pombo, Ricardo Rosa, Ana Rodrigues, João Granado, Ricardo Silva, Filipe Martins, Elói Martins, Samuel Inácio, João Almeida, Ricardo Mendonça, Ricardo Marreiros, Maria João, Carolina Mendes, Fernando Oliveira, Ana Coutinho, José "Flechas", Duarte Brandão, André Moleiro, Carolina Meixeiro, Diana Bordalo, um grande obrigado por todos os momentos de aprendizagem, brincadeira e pelo apoio que me deram.

Agradeço a todos os que me acompanharam ao longo desta viagem pela gloriosa FCT.

Aos meus amigos de longa data, Ricardo Oliveira, Cristiana Serra, Inês Lourenço, Inês Santos, Mariana Araújo, Diane Pereira, Pedro Rodrigues, Pedro Dionísio, Vasco Franco e Rosa Faria, um abraço daqueles.

À Mónica Cavaco, por toda a tua alegria. Não serás esquecida.

Aos meus pais, irmã e avós, pelo apoio, educação e amor que sempre me deram. Não estaria onde estou sem vocês ao meu lado.

Por fim, um agradecimento especial à Cláudia Fernandes por me fazer ver sempre o lado positivo e por nunca me deixar desamparado. Obrigado por todo o teu apoio e companheirismo.

A vós todos, um muito obrigado!



## Resumo

No presente trabalho foi desenvolvido um sistema de imunodeteção, baseado num biossensor capacitivo que integra um par de microelétrodos interdigitais (transdutor). À superfície dos microelétrodos testaram-se dois tipos de matrizes de suporte diferentes para imobilização de anticorpos – membrana comercial de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) e camada de nanopartículas de Óxido de Zinco (nanobastonetes de ZnO). O objetivo da utilização destas matrizes específicas foi maximizar a distribuição dos anticorpos detetores ao longo da região de interação do campo elétrico criado pelo transdutor. A abordagem inovadora deste trabalho (maximizar a distribuição dos anticorpos através da utilização de matrizes de suporte sobre o transdutor) pretende ser uma alternativa simples e económica à utilização de nanoelétrodos, mais dispendiosos e de fabrico complexo.

As membranas de PVDF foram alvo de estudo sobre a influência de um pré-tratamento com álcool na capacidade de difusão dos antígenos na membrana, bem como do processo de bloqueamento da membrana com Albumina do soro bovino e leite magro em pó – habitualmente usados em imunoensaios para aumentar a especificidade de ligação do antígeno ao anticorpo. A deposição da camada de nanobastonetes de ZnO foi realizada durante quatro intervalos de tempo diferentes (1,5, 3, 5 e 7 horas), de forma a seleccionar as condições para maior revestimento da área superficial do transdutor.

Como modelos representativos das interações anticorpo/antígeno foram utilizados dois sistemas distintos: anticorpo anti-PfHsp70 e respetivo antígeno PfHsp70 (*Plasmodium falciparum Heat Shock Protein 70*); anticorpo anti-HRP e respetivo antígeno HRP (Peroxidase de Rábano).

Cada sensor foi analisado por Espectroscopia de Impedância (de 40 Hz a 110 MHz), de forma a detetar alterações de capacidade e impedância resultantes da interação anticorpo/antígeno. Os sensores com membrana de PVDF registaram variações de capacidade baixas (inferiores a 1 pF), mas foram capazes na sua maioria de distinguir entre soluções sem e com antígeno. Nos sensores com nanobastonetes de ZnO, a presença do antígeno HRP produziu um sinal distinto em relação aos controlos negativos (solução tampão e antígeno não-específico). Em todos os sensores (com PVDF e ZnO), a maior variação da capacidade na presença do antígeno foi observada entre 1 e 10 kHz, sugerindo que este intervalo de frequências é ideal para imunodeteção por Espectroscopia de Impedância.

Palavras-chave: biossensores capacitivos, microelétrodos interdigitais, Espectroscopia de Impedância, membranas de PVDF, nanobastonetes de ZnO, imunodeteção.



**Abstract**

The aim of the present work consisted in developing a system for immunodetection based on a capacitive biosensor with interdigitated microelectrodes (transducer). Two different types of 3-dimensional matrixes for the immobilization of antibodies were tested on the microelectrodes' surface – Polyvinylidene Fluoride (PVDF) commercial membrane and a layer of Zinc Oxide nanoparticles (ZnO nanorods). The objective of these matrixes was to maximize the distribution of probes across the measuring zone probed by the electric field created with the transducer. This new approach of combining matrixes with microelectrodes in order to maximize the probes distribution aims to be a simple and economic alternative to the use of more expensive nanoelectrodes with complex manufacture.

Three technical aspects regarding the PVDF membranes were studied: the influence of the membrane pretreatment with alcohol on the penetration capability of the antigen solution across the matrix; the antibody and antigen diffusion across the matrix; the membrane blocking process with bovine serum Albumin (BSA) and non-fat milk – usually used in immunoassays for a more specific binding of antigen to antibody. The ZnO nanorods layer coating was performed during four different time windows (1.5, 3, 5 and 7 hours) in order to choose the condition that allowed the best coating area.

Two distinct systems were applied as representative models for the antibody/antigen binding event: antibody anti-*Pf*Hsp70 and its antigen *Pf*Hsp70 (*Plasmodium falciparum* Heat Shock Protein 70); antibody anti-HRP and its antigen HRP (Horse Radish Peroxidase).

Each sensor was analyzed by Impedance Spectroscopy (from 40 Hz to 110 MHz), in order to detect changes in capacity or impedance as a direct result of antibody/antigen binding event. The sensors with PVDF membranes registered small capacity changes (lower than 1 pF), but most of them were able to distinguish between solutions with and without the antigen. The sensors with ZnO nanorods the presence of the HRP antigen produced a distinct signal from the negative controls (buffer solution and non-specific analite). In all the sensors – both PVDF and ZnO – the major capacity change caused by the antigen's presence was observed between 1 and 10 kHz, suggesting that this frequency range is suitable for immunodetection by Impedance Spectroscopy.

Keywords: capacitive biosensors, interdigitated microelectrodes, impedance spectroscopy, PVDF membranes, ZnO nanorods, immunodetection.



## Índice de Conteúdos

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xix
1 Introdução.....	3
1.1 Objetivos do trabalho.....	3
1.2 Biossensores – Conceitos gerais.....	3
1.2.1 Reconhecimento.....	5
1.2.2 Transdução.....	5
1.2.3 Imobilização.....	6
1.3 Biossensor capacitivo interdigital.....	7
1.3.1 Conceitos gerais.....	7
1.3.2 Espectroscopia de Impedância.....	10
1.4 Anticorpos – Elemento de biorreconhecimento.....	12
1.5 Malária.....	15
1.5.1 Doença, transmissão e diagnóstico.....	15
1.5.2 <i>Heat Shock Protein 70</i> como antígeno de <i>P. falciparum</i> .....	19
1.6 O Sensor proposto – imunobiossensor capacitivo com microelétrodos interdigitais.....	20
2 Parte Experimental.....	27
2.1 Materiais e reagentes.....	27
2.2 Procedimentos gerais.....	27
2.2.1 Sobreexpressão da <i>PfHsp70</i> em <i>E. coli Rosetta Blue</i> .....	27
2.2.2 Purificação, concentração e quantificação da <i>PfHsp70</i> .....	28
2.2.3 Produção, purificação e concentração do anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> .....	28
2.2.4 Biossensor capacitivo interdigital com membrana comercial de PVDF.....	29
2.2.4.1 Elétrodos interdigitais de 50 $\mu\text{m}$ com matriz de imobilização em PVDF (IDC <sub>PVDF</sub> ).....	29
2.2.4.2 IDC <sub>PVDF</sub> I – anti- <i>PfHsp70</i> imobilizado.....	29
2.2.4.3 IDC <sub>PVDF</sub> II – <i>PfHsp70</i> imobilizado.....	30
2.2.4.4 IDC <sub>PVDF</sub> III – teste com HRP em membrana humedecida.....	30
2.2.4.5 IDC <sub>PVDF</sub> IV – teste com HRP (antígeno específico) e <i>PfHsp70</i> (antígeno não específico).....	31
2.2.4.6 IDC <sub>PVDF</sub> V – fixação da membrana de PVDF com cola epóxi.....	31
2.2.4.7 Espectroscopia de Impedância.....	32

2.2.5	Estudo do suporte de imobilização em PVDF.....	33
2.2.5.1	Efeito do pré-tratamento da membrana de PVDF com álcool na penetração da solução com antígeno.....	33
2.2.5.2	Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF.....	34
2.2.6	Difusão do antígeno e anticorpo através da membrana de PVDF.....	36
2.2.6.1	Difusão de antígeno através da membrana de PVDF.....	36
2.2.6.2	Difusão de anticorpo através da membrana de PVDF.....	36
2.2.7	Biossensor capacitivo interdigital com nanobastonetes de ZnO.....	37
2.2.7.1	Deposição de <i>seeds</i> de ZnO sobre os elétrodos interdigitais de 10 $\mu\text{m}$ .....	37
2.2.7.2	Crescimento de nanobastonetes de ZnO sobre os microelétrodos interdigitais.....	37
2.2.7.3	Silanização dos nanobastonetes de ZnO e reticulação do anticorpo anti-HRP.....	38
2.2.7.4	Teste dos biossensores com HRP (antígeno específico) e <i>PfHsp70</i> (antígeno não específico).....	39
2.2.7.5	Espectroscopia de Impedância.....	39
3	Resultados: Apresentação e Discussão.....	43
3.1	Sensor com membrana comercial de PVDF.....	43
3.1.1	Teste do sensor na detecção de <i>PfHsp70</i> e anti- <i>PfHsp70</i> , enquanto analitos, por EI.....	44
3.1.2	Influência do pré-tratamento da membrana de PVDF com álcool na penetração da solução de antígeno através da matriz.....	49
3.1.3	Otimização do processo de bloqueio da membrana de PVDF.....	53
3.1.4	Difusão do anticorpo e antígeno através da membrana de PVDF.....	58
3.1.5	Deteção do analito específico HRP.....	61
3.1.6	Fixação da membrana de PVDF sobre o transdutor, mediada por um filme de cola epóxi.....	62
3.2	Sensor com nanobastonetes de ZnO.....	64
3.2.1	Deposição e caracterização dos nanobastonetes de ZnO à superfície do transdutor.....	64
3.2.2	Deteção do antígeno HRP.....	66
4	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	73
5	Referências Bibliográficas.....	79
6	Anexos.....	85
6.1	Anexo I – Variação da capacidade e impedância para o sensor $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ II.....	85
6.2	Anexo II – Composição elementar da membrana de PVDF tratada com tampão PBST.....	86
6.3	Anexo III – Confirmação da presença do antígeno HRP na membrana do sensor $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ IV.....	87
6.4	Anexo IV – Determinação da espessura do filme fino de cola epóxi.....	87
6.5	Anexo V – Síntese de nanobastonetes de ZnO sobre o transdutor realizada a quatro intervalos de tempo diferentes.....	88

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Esquema geral de um biossensor. O analito (losango vermelho) é reconhecido pelo biorreceptor (Y verde). Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registado pelo sistema digital de aquisição de dados. ....	4
Figura 1.2 – (a) Esquema geral de um biossensor capacitivo interdigital e (b) representação da configuração interdigital dos eléttodos. ....	8
Figura 1.3 – Condensador de placas paralelas constituído por duas placas de um metal condutor separadas por um meio dielétrico (não condutor). ....	9
Figura 1.4 – (a) Onda sinusoidal da tensão (V) e corrente (I) em função do tempo (t), com desvio de fase $\Phi$ . (b) Gráfico Nyquist onde está expresso o módulo da impedância $ Z $ , o ângulo desvio de fase $\Phi$ e a componente real (eixo das abcissas) e imaginária (eixo das ordenadas) da impedância. Figura adaptada <sup>17</sup> . ....	11
Figura 1.5 – Estrutura geral de um anticorpo. Figura adaptada <sup>18</sup> . ....	13
Figura 1.6 – Regiões variáveis e hipervariáveis do anticorpo. Figura adaptada <sup>18</sup> . ....	14
Figura 1.7 – Ciclo de vida do protozoário <i>Plasmodium sp.</i> ....	16
Figura 1.8 – Esquema geral de um RDT. I – a amostra biológica que contém o antigénio (A) é colocada em contato com a tira de nitrocelulose (D). II – ligação do antigénio ao anticorpo conjugado com nanopartículas de Ouro, formando um complexo. III – os complexos difundem pela tira de nitrocelulose e são capturados pelos anticorpos imobilizados na linha de teste (B); os anticorpos conjugados que não ligaram antigénio difundem pela tira de nitrocelulose e são capturados na linha de controlo (C). Esquema não está à escala. ....	18
Figura 1.9 – Biossensores capacitivos interdigitais (IDC): a) IDC com membrana de PVDF comercial colada sobre os microelétrodos interdigitais (50 $\mu\text{m}$ ) de Ouro; b) IDC com nanobastonetes de ZnO sintetizados à superfície dos microelétrodos interdigitais (10 $\mu\text{m}$ ) de Ouro (ampliação dos nanobastonetes obtida por SEM). ....	21
Figura 1.10 – Estrutura química do Fluoreto de Polivinilideno (PVDF). ....	22
Figura 1.11 – Imobilização do anticorpo anti-HRP sobre nanobastonetes ( <i>nanorods</i> ) de ZnO por reticulação: a) silanização dos nanobastonetes com MPTMS; b) ligação do anticorpo ao Sulfo-SMB; c) imobilização do anticorpo sobre o <i>nanorod</i> através da ligação entre o MPTS e o Sulfo-SMB. Esquema não está à escala. ....	23
Figura 1.12 – Esquema da reação de oxidação do substrato cromogénico ABTS, catalisada pela enzima HRP. A oxidação do substrato é concomitante com um aumento da tonalidade verde da solução. ....	24
Figura 2.1 – (a) Analisador de Impedância 4294A e (b) câmara de vácuo. ....	33
Figura 2.2 – Contacto entre pontas de medição e eléttodos do biossensor capacitivo interdigital no interior da câmara de vácuo. ....	33
Figura 2.3 – Reator de síntese de nanobastonetes de ZnO com controlo de temperatura e agitação. ...	38

Figura 3.1 – Corte transversal da membrana comercial de PVDF. Imagem SEM realizada no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (CENIMAT, FCT-UNL). .....	43
Figura 3.2 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> (33 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antigénio – aplicação de tampão PBST; teste com antigénio – aplicação de <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (31 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	44
Figura 3.3 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> (66 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antigénio – aplicação de tampão PBST; teste com antigénio – aplicação de <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (62 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	46
Figura 3.4 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> (100 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antigénio – aplicação de tampão PBST; teste com antigénio – aplicação de <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (93 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	46
Figura 3.5 – Comparação da variação de capacidade do $\text{IDC}_{\text{PVDF I}}$ , no teste com antigénio, para as concentrações de 33, 66 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> imobilizado na membrana de PVDF. ....	47
Figura 3.6 – Comparação da variação de capacidade do $\text{IDC}_{\text{PVDF II}}$ , no teste com anticorpo, para as concentrações de 33, 66 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de antigénio <i>PfHsp70</i> imobilizado na membrana de PVDF. ....	48
Figura 3.7 – Influência do tratamento prévio da membrana de PVDF na capacidade de penetração da solução de antigénio: PVDF seco – membrana seca (caráter hidrofóbico); PVDF hidratado – membrana tratada previamente com Isopropanol 50% (v/v) e hidratada (caráter hidrofílico). .....	50
Figura 3.8 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti-HRP (100 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antigénio – aplicação de tampão PBST; teste com antigénio – aplicação de HRP em tampão PBST (59 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	51
Figura 3.9 – Capacidade nominal de dois sensores $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ (A e B) para as frequências 1 kHz (■), 10 kHz (□), 100 kHz (▲) e 1000 kHz (◇), ao longo de 6 adições de tampão PBST (100 $\mu\text{L}$ ) sobre a membrana de PVDF sem anticorpo. Entre cada adição de solução as membranas dos sensores foram reidratadas. A adição 0 representa a capacidade inicial do sensor. ....	52
Figura 3.10 – Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF com BSA. Ensaio A – bloqueio com 100 $\mu\text{L}$ de BSA 0,2% (p/v) durante 1 hora (a). Ensaio B – bloqueio com 100 $\mu\text{L}$ de BSA 0,2% (p/v) durante 16 horas (b). Ensaio C – bloqueio com solução de BSA 5% (p/v) durante 1 hora (c). A membrana de PVDF sem antigénio e a membrana de PVDF apenas com antigénio constituem o	

---

controlo negativo e positivo, respetivamente. Cada membrana de PVDF foi produzida em duplicado. ....	54
Figura 3.11 – Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF com leite em pó. Ensaio D – bloqueio com solução de leite em pó 5% (p/v) durante 1 hora (a). Ensaio E – bloqueio com solução de leite em pó 5% (p/v) durante 1 hora e aumento da concentração de anticorpo imobilizado para 200 µg/mL (b). A membrana de PVDF sem antigénio e a membrana de PVDF apenas com antigénio constituem o controlo negativo e positivo, respetivamente. Cada membrana de PVDF foi produzida em duplicado. ....	57
Figura 3.12 – Determinação da distribuição do anticorpo através da membrana de PVDF após o processo de imobilização. Membrana de referência (□) – fluorescência de fundo da membrana de PVDF. Membrana tratada com anticorpo (●) – fluorescência emitida pelo fluoróforo FITC conjugado com o anticorpo anti-IgG de rato. ....	59
Figura 3.13 – Difusão do antigénio HRP através da membrana de PVDF com anticorpo anti-HRP imobilizado e bloqueada com leite em pó 5% (p/v). Uma segunda membrana de PVDF, não tratada, foi colocada sob a membrana com anticorpo, de forma a captar o antigénio que atravessasse completamente a membrana superior. ....	60
Figura 3.14 – Comparação da variação de capacidade do IDC <sub>PVDF</sub> IV, para membranas com o anticorpo anti-HRP testadas na ausência de antigénio (tampão PBST), na presença de antigénio HRP (antigénio específico) e teste com <i>PfHsp70</i> (antigénio não específico). O anticorpo anti-HRP (200 µg/mL, 100 µL) foi imobilizado nas membranas, com bloqueio posterior com leite em pó 5% (p/v). Sobre os respetivos sensores foram aplicados 100 µL de solução de HRP (117 µg/mL) ou de <i>PfHsp70</i> (187 µg/mL). ....	61
Figura 3.15 – Comparação da variação de capacidade do IDC <sub>PVDF</sub> V, para o teste sem antigénio (tampão PBST), teste com antigénio HRP (analito específico) e teste com <i>PfHsp70</i> (analito não específico). No fabrico do sensor foi utilizada cola epóxi para fixar a membrana sobre os microelétrodos. Anticorpo anti-HRP (200 µg/mL, 100 µL) foi imobilizado nas membranas, com bloqueio posterior com leite em pó 5% (p/v). Sobre os respetivos sensores foram aplicados 100 µL de solução de HRP (117 µg/mL) e <i>PfHsp70</i> (187 µg/mL). ....	63
Figura 3.16 – Caracterização dos nanobastonetes de ZnO sintetizados à superfície do transdutor. Imagem SEM realizada no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (CENIMAT, FCT-UNL). ....	66
Figura 3.17 – Avaliação da estabilidade dos nanobastonetes de ZnO após contato com a solução de tampão PBS. O transdutor com nanobastonetes foi lavado duas vezes com tampão PBS. As nanoestruturas permaneceram intactas após o contato com o tampão, como se pode observar nas regiões circuladas a vermelho. ....	66

---

Figura 3.18 – Comparação da componente real ( $Z_{Re}$ ) e imaginária ( $Z_{Im}$ ) da impedância para cada passo da construção e teste dos três sensores: a) sensor testado com tampão PBS; b) sensor testado com solução de <i>PfHsp70</i> (analito não específico); c) sensor testado com antigénio HRP (analito específico). .....	67
Figura 3.19 – (a) Comparação da variação da capacidade do sensor $IDC_{ZnO}$ para as soluções de tampão PBS, <i>PfHsp70</i> (analito não específico) e antigénio HRP (analito específico). (b) Confirmação da presença do antigénio HRP no sensor através da oxidação do substrato ABTS. Apenas a solução em contato com o sensor com HRP sofreu alteração de cor, confirmando a presença do antigénio. ....	69
Figura 6.1 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antigénio <i>PfHsp70</i> (33 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti- <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (141 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	85
Figura 6.2– Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antigénio <i>PfHsp70</i> (66 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti- <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (283 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	85
Figura 6.3 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antigénio <i>PfHsp70</i> (100 $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti- <i>PfHsp70</i> em tampão PBST (429 $\mu\text{g/mL}$ ). .....	86
Figura 6.4 – Confirmação da presença do antigénio HRP na membrana do sensor $IDC_{PVDF}$ IV: (a) sensor com HRP presente na membrana, confirmado pela alteração de cor da solução de ABTS; (b) controlo negativo onde não se observa alteração de cor da solução de ABTS (sensor com <i>PfHsp70</i> ). 87	87
Figura 6.5 – Determinação da espessura do filme fino de cola epóxi entre o substrato de vidro e a membrana de PVDF. A – membrana de PVDF (120 $\mu\text{m}$ ); B – filme fino de cola epóxi (50 $\mu\text{m}$ ); C – substrato de vidro (1 mm). .....	87
Figura 6.6 – Síntese de nanobastonetes de ZnO sobre o transdutor realizada em quatro intervalos de tempo diferentes: (a) 1,5 horas; (b) 3 horas; (c) 5 horas; (d) 7 horas. ....	88

**Índice de Tabelas**

Tabela 1.1 – Resumo das dificuldades apresentadas pelos métodos atuais convencionais para diagnóstico de malária <sup>26</sup> .....	19
Tabela 2.1 – Condições de imobilização do anticorpo, bloqueio e lavagens das membranas de PVDF nos ensaios de otimização do processo de bloqueio.....	35
Tabela 3 – Composição elementar de uma seção de membrana de PVDF tratada com tampão PBST. A percentagem de cada elemento foi determinada por Espectroscopia de Energia Dispersiva. ....	86



**Lista de Abreviaturas**

ABTS – 2,2'-Azina-bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico)

Anti-HRP – anticorpo policlonal anti-Peroxidase de Rábano

Anti-*Pf*Hsp70 – anticorpo monoclonal anti-Hsp70 de *Plasmodium falciparum*

BSA – Albumina do soro bovino

C – Capacidade

HRP – Peroxidase de Rábano

I(t) – Corrente

IDC – Sensor capacitivo interdigital

IDC<sub>PVDF</sub> – Sensor capacitivo interdigital com membrana de PVDF

IDC<sub>ZnO</sub> – Sensor capacitivo interdigital com nanobastonetes de ZnO

PBS – Tampão Fosfato salino

PBST – Tampão Fosfato salino com Tween-20

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

*Pf*Hsp70 – *Heat Shock Protein 70* de *Plasmodium falciparum*

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

Q – Carga

RDTs – *Rapid diagnostic tests*

V(t) – Tensão

Z – Impedância

Z<sub>Im</sub> – Componente imaginária da impedância

ZnO – Óxido de Zinco

Z<sub>Re</sub> – Componente real da impedância



# **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**



## 1 Introdução

### 1.1 Objetivos do trabalho

O objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um sistema de imunodeteção, baseado num biossensor capacitivo que integra um transdutor com um par de microelétrodos interdigitais. Como modelos representativos das interações anticorpo/antigénio foram utilizados: a) anticorpo monoclonal anti-*Pf*Hsp70 e o respetivo antigénio *Pf*Hsp70 (marcador molecular de *Plasmodium falciparum* (*Pf*), agente etiológico da malária); b) anticorpo policlonal anti-Peroxidase de Rábano (HRP) e o respetivo antigénio HRP. De forma a maximizar a distribuição das biomoléculas ao longo da zona de interação do campo elétrico criado pelo transdutor, foram analisadas duas alternativas de matriz de suporte à imobilização (camada sensível): a) membrana comercial *Immobilon-P* de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) colada sobre o transdutor; b) camada de nanopartículas de Óxido de Zinco sintetizada à superfície do transdutor.

A membrana de PVDF foi alvo de estudo sobre o efeito do pré-tratamento com álcool na penetração das soluções através da matriz, sobre a capacidade de difusão das biomoléculas, bem como do processo de bloqueio. Para a camada de nanopartículas de Óxido de Zinco estudou-se o tempo de síntese (1,5, 3, 5 e 7 horas), de forma a selecionar a condição que produzisse a melhor camada à superfície do transdutor.

Cada sensor foi caracterizado por Espectroscopia de Impedância num intervalo de frequência de 40 Hz a 110 MHz, de forma a detetar alterações na capacidade e impedância do sistema resultantes das interações anticorpo/antigénio.

### 1.2 Biossensores – Conceitos gerais

A criação do conceito de um biossensor data de 1962 e foi atribuída a Leland C. Clark Jr. O dispositivo proposto por Clark consistia num eletrodo de Oxigénio com uma membrana interior semipermeável a Oxigénio e uma membrana de diálise acoplada, contendo a enzima Oxidase da Glucose. O aparelho era capaz de determinar a concentração de Glucose presente numa amostra, através da diminuição proporcional da concentração de Oxigénio medida durante a oxidação da  $\beta$ -D-Glucose<sup>1,2</sup>.

O sensor de glucose construído por Clark foi a base de inúmeras variações de sensores posteriores. Em 1975 foi lançado comercialmente o primeiro sensor de Glucose amperométrico, baseado no modelo de Clark, cujo alvo de deteção era o Peróxido de Hidrogénio formado após oxidação da  $\beta$ -D-Glucose<sup>1,2</sup>.

Um biossensor é descrito como um aparelho analítico que integra um elemento biológico e um elemento transdutor físico-químico e que produz um sinal elétrico proporcional à presença e/ou concentração de um ou múltiplos analitos existentes numa amostra<sup>1,3-5</sup>. É portanto um dispositivo capaz de detetar analitos recorrendo a interações mediadas pelo elemento biológico, convertendo a sua presença num sinal elétrico mensurável e quantificável. Em termos de vantagens que o caracterizam, um biossensor deve ser um dispositivo de fácil utilização, autónomo, pouco dispendioso (geralmente biossensores comerciais), rápido a fornecer informação, robusto, sensível e preciso, que necessita de um pequeno volume de amostra e que, na maioria das vezes, pode ser reutilizável<sup>4,5</sup>. Desde a sua génese, os biossensores têm tido grande aplicação nos campos da medicina, controlo de processos farmacológicos, segurança alimentar e monitorização ambiental<sup>4,6</sup>.

Um sistema completo de medida com um biossensor integra normalmente três componentes principais: um elemento biológico (biorreceptor), um elemento transdutor e um sistema de aquisição de dados<sup>1-4</sup>. O biossensor pode ainda ter associado um componente de preparação da amostra, tal como um sistema de filtração composto por membranas (ex.: sensor de Glucose moderno)<sup>2,5</sup>. O biorreceptor responsável pela deteção do analito, pode ser constituído por uma variedade de agentes biológicos, tais como, microrganismos, proteínas, ácidos nucleicos, ou por agentes que mimetizam propriedades biológicas de catálise ou afinidade (ex.: moléculas sintéticas)<sup>1,4</sup>. Da interação entre o biorreceptor e o analito resulta uma modificação físico-química do meio (ex.: aumento de massa, alteração de cor, alteração de potencial, variação de temperatura) que é medida e transformada pelo transdutor num sinal elétrico<sup>1-3</sup>. Por último, o sinal elétrico produzido é convertido e apresentado pelo sistema de aquisição de dados num formato capaz de ser analisado e interpretado<sup>2,3</sup>. Na Figura 1.1 encontra-se um esquema geral de um biossensor.

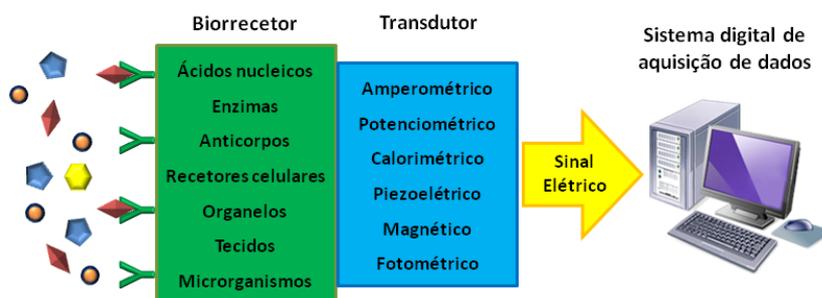


Figura 1.1 – Esquema geral de um biossensor. O analito (losango vermelho) é reconhecido pelo biorreceptor (Y verde). Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registado pelo sistema digital de aquisição de dados.

### 1.2.1 Reconhecimento

O elemento biológico é responsável pela especificidade e sensibilidade do biossensor<sup>5</sup>. A escolha do biorreceptor deve ter em conta o analito a detetar, bem como a sua concentração, a natureza da amostra (ex.: gota de sangue, gás, tecido) e o tipo de medição a efetuar<sup>1</sup>. Consoante a natureza do elemento biológico incorporado, os biossensores podem ser classificados em dois grupos – catalíticos/metabólicos ou de afinidade<sup>3</sup>.

Os biossensores catalíticos têm como elementos biológicos enzimas, organelos, tecidos e microrganismos e servem-se dos produtos gerados durante a atividade metabólica (metabolitos ou calor), quando na presença da molécula-alvo, como intermediários no processo de deteção<sup>3</sup>. O sinal produzido é proporcional à concentração dos produtos formados ou ao calor libertado, durante a atividade metabólica.

No caso dos biossensores de afinidade a deteção é feita através da ligação específica do analito ao elemento biológico, sem produção de metabolitos. Estes sensores baseiam-se na afinidade entre anticorpo-antígeno, hibridação entre cadeias de DNA complementares e receptores celulares (ex.: afinidade entre neurorreceptores e neurotransmissores)<sup>3</sup>. Neste tipo de biossensor, as interações não-específicas devem ser minimizadas tanto quanto possível de forma a garantir que o sinal produzido seja exclusivamente proporcional à ligação dos analitos às biomoléculas imobilizadas no sensor<sup>3</sup>.

### 1.2.2 Transdução

O transdutor é o elemento do biossensor responsável pela transformação do sinal biológico num sinal elétrico, que por sua vez pode ser amplificado, medido, registado e analisado. A escolha do tipo de elemento transdutor integrado no dispositivo deve ter em conta a natureza do sinal biológico e o tipo de medição que se pretende efetuar (por exemplo, utilização de um sistema de elétrodos para medir a alteração de potencial resultante da oxidação ou redução de um substrato enzimático)<sup>1-3</sup>. O biossensor também pode ser classificado de acordo com o tipo de transdutor aplicado:

- Calorimétrico – mede variações de calor provocadas por reações exotérmicas desencadeadas pela interação entre o elemento biológico e o analito. A variação da entalpia do sistema é proporcional à concentração do analito presente<sup>3</sup>.
- Ótico – mede a alteração de propriedades (ex.: amplitude, energia, polarização, fase) da luz emitida pelo dispositivo, resultante da interação entre o biorreceptor e o analito. O princípio de deteção pode basear-se em colorimetria (alteração de cor da amostra), interferometria (diferença de fase entre ondas que atravessam a amostra), luminescência e fluorescência. Os

transdutores óticos oferecem inúmeras possibilidades de biossensores, uma vez que podem ser usados virtualmente em todos os tipos de espectroscopia ótica<sup>3,5,7</sup>.

- Baseado em massa – mede pequenas alterações de massa utilizando transdutores piezoelétricos de onda acústica. O elemento transdutor ressoa a uma determinada frequência por aplicação de um sinal elétrico. Quando o elemento biológico localizado à superfície do transdutor se liga ao analito, ocorre um aumento da massa do sistema, resultando numa diminuição proporcional da frequência de ressonância<sup>3,7</sup>.
- Eletroquímico – mede o sinal eletroquímico produzido pela interação bioquímica do elemento biológico e analito. A reação bioquímica resultante produz ou consome espécies eletroativas (iões ou eletrões), alterando as propriedades eletroquímicas da amostra que são detetadas pelo biossensor. Consoante a propriedade analisada, o sensor pode ser classificado como potenciométrico (deteta alteração do potencial da amostra), amperométrico (mede a corrente gerada entre dois eléctrodos por determinado potencial), condutimétrico ou impedimétrico (mede alterações de condutividade ou de impedância elétrica da amostra, respetivamente)<sup>3,6</sup>.

### 1.2.3 Imobilização

Para que o biossensor se mantenha funcional durante o seu tempo de vida é necessário que o elemento biológico esteja protegido e ligado de forma eficaz ao dispositivo. Devido à sua natureza, o biorrecetor é um elemento frágil, suscetível de degradação ou inativação causadas por alterações de pH, temperatura ou pela presença de outras espécies reativas<sup>1</sup>. A imobilização do elemento biológico numa matriz estável pode prolongar o tempo de vida operacional e aumentar a termoestabilidade do biorrecetor<sup>8</sup>.

A escolha do suporte de imobilização deve ser feita tendo em conta a natureza do elemento biológico, o tipo de medição a realizar, as condições do meio em que o dispositivo será utilizado e ainda a natureza da amostra.

Os processos de imobilização de biomoléculas em suportes são variados, mas podem dividir-se geralmente em métodos físicos e químicos. Os métodos físicos (ex.: adsorção, encapsulação, imobilização em matrizes) são simples, mas a interação entre o suporte e a biomolécula é fraca, podendo resultar na perda do elemento biológico. Os métodos químicos são mais complexos, requerendo muitas vezes o uso de solventes adicionais. No entanto, em comparação com os métodos físicos, a força da interação entre o biorrecetor e o suporte é superior, tratando-se muitas vezes de ligações covalentes (ex.: reticulação ou *cross-linking*)<sup>8</sup>. Os processos de imobilização mais utilizados na construção de biossensores são<sup>6</sup>:

- Adsorção física – a ligação das biomoléculas à superfície do sensor resulta da combinação de forças Van der Waals, hidrofóbicas, iónicas e pontes de hidrogénio. O método é bastante simples, no entanto, as biomoléculas não estão ligadas fortemente ao sensor, podendo libertar-se com alguma facilidade.
- Imobilização covalente sobre a superfície – a superfície do sensor é modificada de forma a apresentar grupos funcionais onde as biomoléculas se podem ligar. O método produz uma distribuição e densidade homogénea das biomoléculas, bem como uma maior reprodutibilidade e homogeneidade da superfície do sensor. Pode também reduzir ou até mesmo eliminar situações de instabilidade, difusão ou agregação das biomoléculas.
- Imobilização dentro de matrizes – as biomoléculas são imobilizadas no interior de matrizes porosas poliméricas, geralmente de poliacrilamida, amido, alginato, sílica gel, cloreto polivinil, acetato de celulose. Este método apresenta a desvantagem de as biomoléculas poderem escapar da membrana durante a utilização do sensor, diminuindo a sensibilidade.
- Reticulação entre moléculas – consiste na ligação intermolecular por reticulação de biomoléculas com reagentes bi ou multifuncionais. Este método cria várias camadas de material que podem diminuir a atividade dos elementos biológicos, bem como dificultar os processos de difusão, podendo representar um entrave ao bom funcionamento do sensor.
- Encapsulação – as biomoléculas são revestidas por uma membrana, formando uma matriz de encapsulação porosa, que facilita o processo de ligação ao sensor. A matriz protege o material biológico das condições fisiológicas externas. No entanto, o método apresenta limitações em termos difusionais para o interior da matriz e na reprodutibilidade em termos da dimensão da cápsula.

Como suportes de imobilização têm sido utilizados suportes sólidos, membranas de diálise, lipossomas, fibras ocas, microcápsulas, géis, superfícies automontáveis, matrizes de Sílica-gel, materiais poliméricos (ex.: Quitosano) e nanomateriais<sup>8-10</sup>.

### **1.3 Biossensor capacitivo interdigital**

#### **1.3.1 Conceitos gerais**

O biossensor capacitivo interdigital consiste num dispositivo que integra um elemento biológico imobilizado sobre um sistema de dois elétrodos planares. O dispositivo mede alterações nas propriedades dieléctricas do meio (junto à superfície dos elétrodos) como resultado da interação entre o biorrecetor e o analito<sup>11-13</sup>.

Um biossensor capacitivo interdigital comum é composto por um substrato (suporte) inerte (não condutor), uma camada sensível (finita), resultante da imobilização de um elemento de reconhecimento biológico à superfície do transdutor, e uma camada de ar (infinita)<sup>13</sup>. À superfície do substrato (geralmente um suporte de vidro) são depositados os elétrodos (realizados com metais condutores, constituídos geralmente por Paládio, Titânio, Platina ou Ouro) numa configuração planar que se assemelha a dedos entremeados, da qual resulta a designação interdigital. Esta configuração permite um espaçamento muito próximo entre dois “dedos” adjacentes, sendo o espaço vazio entre eles preenchido por um material dielétrico (não condutor)<sup>11,12</sup>. Na Figura 1.2 está representado um esquema geral de um biossensor capacitivo interdigital.

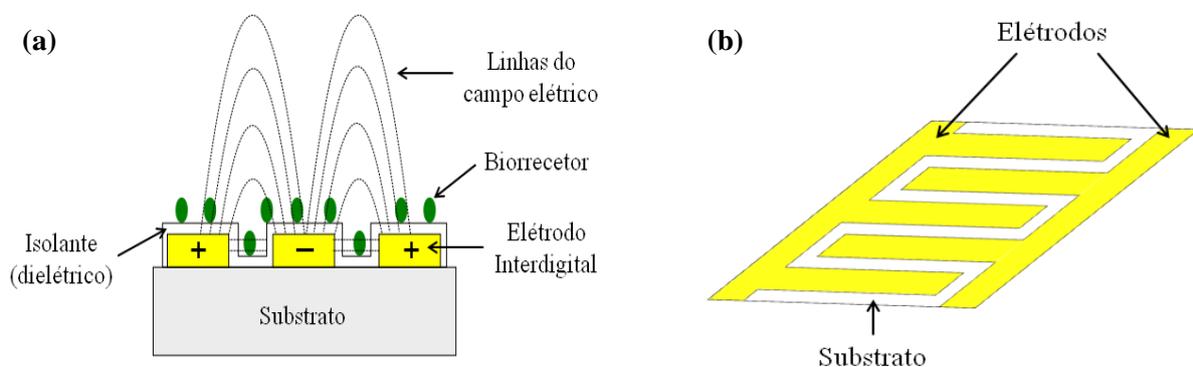


Figura 1.2 – (a) Esquema geral de um biossensor capacitivo interdigital e (b) representação da configuração interdigital dos elétrodos.

O elemento de reconhecimento biológico é imobilizado sobre o material dielétrico ou diretamente neste. Quando ocorre uma alteração no material dielétrico, resultante de uma reação bioquímica ou de um fenómeno de ligação entre biorreceptor e analito (ex.: complementaridade entre cadeias de ácidos nucleicos, interações anticorpo/antigénio, neurorreceptor/neurotransmissor), as propriedades dielétricas do meio entre os elétrodos variam, provocando uma alteração da capacidade do sistema<sup>11</sup>. A capacidade é definida como a aptidão do sistema para armazenar carga elétrica. Na sua forma mais simples a capacidade é descrita como o quociente entre a carga (Q) armazenada sobre a tensão (V) aplicada (ver Equação 1). O dispositivo que possui capacidade é um condensador e consiste em duas placas de metais condutores separadas por um meio isolante (dielétrico). Desta forma, os biossensores capacitivos interdigitais comportam-se como um condensador de placas paralelas (ver Figura 1.3)<sup>11,14</sup>. A capacidade de um condensador de placas paralelas é dada pela Equação 2<sup>11</sup>.

$$C = \frac{Q}{V} \quad (1)$$

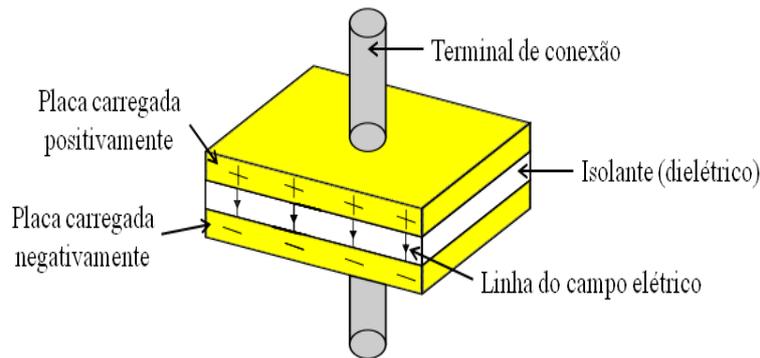


Figura 1.3 – Condensador de placas paralelas constituído por duas placas de um metal condutor separadas por um meio dielétrico (não condutor).

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_0 A}{d} \quad (2)$$

onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio entre as placas,  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo (8,85419 pF/m),  $A$  e  $d$  são a área das placas e distância entre elas, respetivamente.

Em meados da década de 80 foi publicado o primeiro artigo referente a um sensor de afinidade com um transdutor capacitivo. A medição era feita em meio líquido e o princípio de deteção consistia em observar alterações nas propriedades dielétricas, distribuição de carga e conformacionais resultantes da formação do complexo anticorpo/antígeno à superfície de um microelétrodo interdigital<sup>11,15</sup>. Apesar da inovação, os primeiros sensores capacitivos interdigitais apresentavam uma grande lacuna, pois as variações das propriedades dielétricas registadas eram pequenas<sup>15</sup>. O problema residia no facto de a região de distribuição do campo elétrico (ordem dos  $\mu\text{m}$ ) ser muito superior à camada sensível criada pela imobilização do biorreceptor à superfície do elétrodo (1 a 100 nm no caso de proteínas imobilizadas; até 200 nm no caso de cadeias de ácidos nucleicos). A camada sensível representava uma pequena fração do sinal captado pelo campo elétrico, sendo que a maioria do sinal era composto por ruído provocado pela movimentação de cargas provenientes da solução, mascarando assim as interações que ocorriam diretamente à superfície do microelétrodo<sup>11</sup>. Uma forma de resolver este problema consiste no desenvolvimento de elétrodos interdigitais à nanoescala. Neste tipo de elétrodos, a região de distribuição do campo elétrico (ordem dos nm) é reduzida para cobrir quase exclusivamente a camada sensível à superfície do elétrodo, minimizando a influência do ruído de fundo provocado pela solução. Como consequência, os biossensores capacitivos interdigitais constituídos por nanoelétrodos apresentam maior sensibilidade face aos sensores com microelétrodos<sup>15</sup>.

Os biossensores capacitivos interdigitais têm atraído atenção na área da química eletroanalítica nos últimos anos devido às suas características e vantagens em termos de aplicações práticas<sup>11,12,16</sup>:

- a) O método de detecção não requer a utilização de sondas marcadas, como por exemplo, cadeias de oligonucleótidos marcadas com fluoróforo, sendo suficientemente sensível para detetar alterações conformacionais resultantes da interação entre o elemento de reconhecimento e o analito. Os sensores apresentam-se como um sistema de fácil utilização capaz de efetuar medições diretas.
- b) A configuração interdigital planar aplicada resulta numa maior área superficial dos elétrodos, bem como numa camada sensorial maior. Esta geometria permite, portanto, uma maior sensibilidade para alterações que ocorram à superfície dos elétrodos quando comparado com o modelo convencional de detecção de variações à superfície de um único eletrodo de trabalho.
- c) A escala reduzida dos elétrodos interdigitais (200 nm a 50  $\mu\text{m}$ ) permite maior portabilidade em comparação com os elétrodos convencionais e a utilização de pequenos volumes de reagentes e amostra.
- d) A configuração interdigital dos elétrodos apresenta uma vantagem adicional face ao modelo da célula eletroquímica convencional (três elétrodos: referência, trabalho e secundário), uma vez que não necessita de um terceiro eletrodo.

### 1.3.2 Espectroscopia de Impedância

A Espectroscopia de Impedância (EI) é um método de análise que caracteriza a impedância de um sistema, sendo sensível a fenómenos de superfície e de alterações das propriedades dielétricas do meio. Por estas razões, a EI é uma técnica muito interessante na área dos biossensores como método de detecção da ligação entre o elemento de reconhecimento biológico do sensor e o analito<sup>12,17</sup>.

A impedância de um sistema é determinada através do registo da corrente em resposta à aplicação de uma tensão sinusoidal de baixa amplitude (geralmente 5-250 mV). Com esta relação, a impedância ( $Z$ ) pode ser definida como o quociente entre a tensão aplicada ( $V$ ) e a corrente gerada ( $I$ ) em função do tempo ( $t$ )<sup>11,12,17</sup>:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} \quad (3)$$

$$V(t) = V_0 \sin(2\pi ft) \quad (4)$$

$$I(t) = I_0 \sin(2\pi ft + \Phi) \quad (5)$$

A impedância é um valor complexo, uma vez que a tensão e a corrente podem variar tanto em amplitude como em fase. A impedância pode ser expressa pelo seu módulo ( $|Z|$ ) e ângulo do desvio de fase ( $\Phi$ ) ou pela sua parte imaginária ( $Z_{Im}$ ) e parte real ( $Z_{Re}$ ) (ver Figura 1.4)<sup>11,12</sup>:

$$|Z| = \sqrt{Z_{Re}^2 + Z_{Im}^2} \quad (6)$$

$$\Phi = \frac{180 \arctan \frac{Z_{Im}}{Z_{Re}}}{\pi} \quad (7)$$

$$Z_{Re} = \frac{C \tan \delta}{2\pi f C^2 + C \tan \delta^2} \quad (8)$$

$$Z_{Im} = \frac{C}{2\pi f C^2 + C \tan \delta^2} \quad (9)$$

onde  $f$  é a frequência (Hz);  $\Phi$  é o ângulo do desvio de fase ( $^\circ$ ) entre a tensão  $V(t)$  (V) e a corrente  $I(t)$  (A);  $|Z|$ ,  $Z_{Re}$  e  $Z_{Im}$  são respetivamente o módulo, componente real e componente imaginária da impedância ( $\Omega$ );  $C$  é a capacidade (F);  $\tan \delta$  é a tangente de perdas.

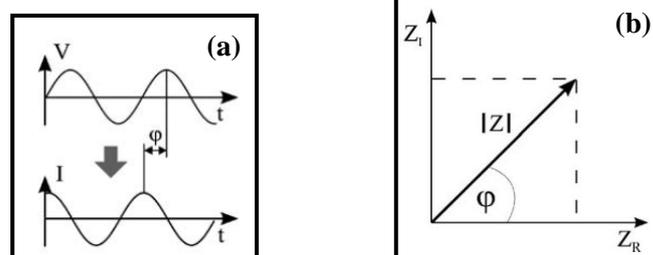


Figura 1.4 – (a) Onda sinusoidal da tensão (V) e corrente (I) em função do tempo (t), com desvio de fase  $\Phi$ . (b) Gráfico Nyquist onde está expresso o módulo da impedância  $|Z|$ , o ângulo desvio de fase  $\Phi$  e a componente real (eixo das abcissas) e imaginária (eixo das ordenadas) da impedância. Figura adaptada<sup>17</sup>.

Uma característica importante da EI e da qual resulta a sua classificação de método de espectroscopia é que permite obter informação sobre a impedância do sistema num largo espectro de frequências (desde  $\mu\text{Hz}$  até  $\text{MHz}$ ), uma vez que a tensão e a corrente são dependentes da frequência, como se pode verificar nas Equações 4 e 5. Esta característica é uma vantagem quando o sistema em estudo não é conhecido e permite a caracterização de superfícies, camadas, membranas e de sistemas de troca e difusão de analitos<sup>11,17</sup>.

Para se obter uma correta caracterização da impedância do sistema em estudo é necessário observar as seguintes condições<sup>12</sup>:

- A resposta do sistema deve estar relacionada exclusivamente com o sinal de perturbação aplicado, sendo para isso necessário assegurar que os estímulos externos (ex.: flutuações de temperatura e humidade) se mantêm constantes, não influenciando a medida.
- O sistema deve reagir linearmente com o sinal de perturbação, pelo que a impedância deve ser independente da amplitude da tensão aplicada.
- O sistema deve permanecer estável durante a realização da medição e não deve sofrer alterações provocadas pela aplicação da perturbação.
- A impedância deve ser uma função contínua e finita no intervalo de frequência aplicado na medição.

Para além da caracterização do sistema, a EI permite recolher informação com fins analíticos. Quando ocorre uma alteração no sistema provocada pela presença do analito, os elementos constituintes da impedância (capacidade ou resistência) variam. A variação total da impedância pode então ser correlacionada com uma alteração de concentração no meio ou com um evento de ligação entre um biorreceptor e o respetivo analito. Pode ainda efetuar-se uma medida mais simples, por determinação da impedância num pequeno intervalo de frequências ou apenas numa frequência específica onde as alterações forem mais acentuadas<sup>12,15</sup>.

#### **1.4 Anticorpos – Elemento de biorreconhecimento**

Os anticorpos são glicoproteínas produzidas por células B do sistema imunitário, característico dos animais vertebrados. Os anticorpos são responsáveis pela deteção e inativação de agentes invasores externos (patogénicos) ao organismo, desencadeando uma resposta imunitária. Coletivamente designam-se por imunoglobulinas (Ig) e representam cerca de 20% das proteínas totais presente no plasma. Os agentes patogénicos (ex.: macromoléculas, vírus, bactérias, eucariontes unicelulares) que desencadeiam uma resposta imunitária, tendo por isso um anticorpo associado, designam-se por antigénios. A região de um antigénio que é reconhecida pelo anticorpo denomina-se determinante

antigénico ou epítipo. Os anticorpos são capazes de distinguir antígenos bastante semelhantes, como por exemplo, duas proteínas que diferem entre si num único aminoácido ou mesmo dois isómeros<sup>18</sup>.

Estruturalmente os anticorpos são macromoléculas em forma de Y com dois locais de ligação de antígeno nas regiões N-terminais (ver Figura 1.5). A estrutura básica de um anticorpo é composta por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias idênticas leves (cadeias L) e duas cadeias idênticas pesadas (cadeias H). As cadeias L são constituídas por cerca de 220 aminoácidos, enquanto as cadeias H são constituídas por 440 aminoácidos. As quatro cadeias estão ligadas entre si por uma combinação de ligações não-covalentes e pontes dissulfureto. Cada local de ligação de antígeno é constituído por uma cadeia L e H (ver Figura 1.5). A região flexível permite que a distância entre os dois locais de ligação varie, aumentando a eficiência da ligação de antígenos ao anticorpo<sup>18</sup>.

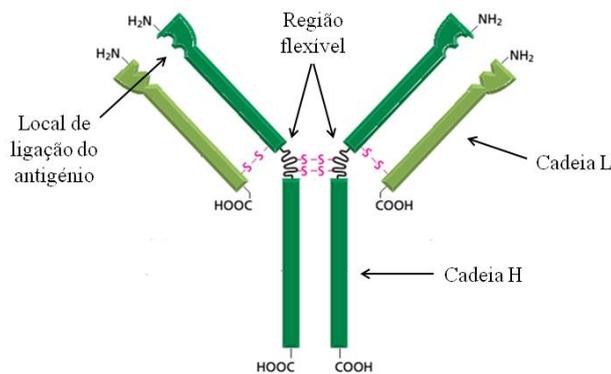


Figura 1.5 – Estrutura geral de um anticorpo. Figura adaptada<sup>18</sup>.

Nos mamíferos existem cinco classes de imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), que diferem no tipo de cadeia H ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respetivamente). Cada cadeia H confere uma conformação distinta à região central e C-terminal da própria cadeia, pelo que cada classe de imunoglobulinas tem propriedades características. As cadeias leves também diferem quanto ao tipo, podendo ser do tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Das cinco classes, a imunoglobulina G (IgG) é a que está presente em maior quantidade no sangue<sup>18</sup>.

A diversidade dos locais de ligação de antígeno resulta da variabilidade da sequência de aminoácidos das regiões N-terminais das cadeias L e H (ver Figura 1.6). A diversidade ocorre em três pequenas regiões hipervariáveis da região variável de ambas as cadeias, sendo que apenas 5 a 10 aminoácidos em cada região hipervariável formam o local de ligação de antígeno, pelo que o tamanho do epítipo reconhecido pelo anticorpo é relativamente pequeno. O evento de ligação entre anticorpo e antígeno é

reversível, sendo a força da interação determinada pela soma da contribuição de várias interações não-covalentes (pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas, forças Van der Waals) e interações iónicas<sup>18</sup>.

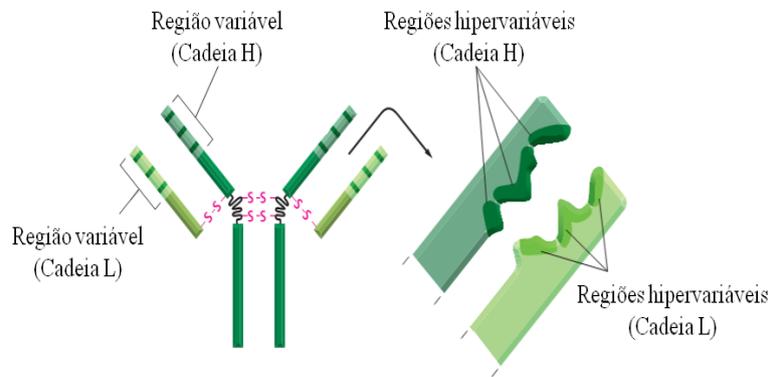


Figura 1.6 – Regiões variáveis e hipervariáveis do anticorpo. Figura adaptada<sup>18</sup>.

Os imunobiossensores incorporam a especificidade da interação entre anticorpo e antígeno com o mecanismo de transdução na geração de um sinal<sup>4,5</sup>. Como elemento de biorreconhecimento os anticorpos apresentam a especificidade e sensibilidade necessárias para baixos níveis de detecção molecular, donde resulta a sua grande aplicação na área dos biossensores<sup>5</sup>.

Os anticorpos incorporados num sensor podem ser de três tipos: policlonal, monoclonal ou fragmentos de anticorpos<sup>4,5</sup>:

- **Policlonais** – resultam da resposta imunitária inata de um organismo vertebrado a um agente patogénico. São produzidos por diferentes células B contra vários epítopos diferentes. Os anticorpos policlonais são produzidos normalmente através da imunização de um animal vertebrado (por exemplo, coelho ou rato) com determinado antígeno, sendo que após o período de incubação é extraído soro do animal. O soro policlonal apresenta então uma população grande e diversificada de anticorpos específicos para epítopos diferentes do mesmo antígeno. Um método alternativo de produção de anticorpos policlonais consiste na inoculação por via oral de galinhas, recolhendo posteriormente a gema dos ovos, que contém anticorpos transferidos pela progenitora<sup>4,5,19</sup>.
- **Monoclonais** – são produzidos pela mesma linhagem de células B, pelo que todos reconhecem o mesmo epítipo do antígeno. O método de produção de anticorpos monoclonais consiste na imunização de um animal vertebrado, posteriormente células B do baço, fundindo-as com células de mieloma, formando um híbrido (célula imortal secretora de anticorpos). Os híbridos são selecionados para o anticorpo desejado e são cultivados, geralmente, em bioreactores de onde são extraídos finalmente os anticorpos<sup>20,21</sup>.

- Fragmentos – os anticorpos são lisados em fragmentos das regiões que os constituem, através do recurso a proteases (pepsina ou papaína). Apenas o fragmento da região de ligação do antígeno (Fab – *antigen-binding fragment*) é que tem interesse prático para a aplicação em imunossensores. Os fragmentos de anticorpo podem ainda ser digeridos em fragmentos de cadeia simples variável (scFv – *single chain variable fragment*), sem que haja perda de especificidade<sup>4</sup>.

Os anticorpos monoclonais integrados em sensores permitem a obtenção de testes mais específicos. Porém o processo de fabrico dos anticorpos monoclonais é mais dispendioso e a sua manutenção é mais difícil, quando comparados com os anticorpos policlonais<sup>5</sup>. Por sua vez os fragmentos de anticorpos apresentam uma vantagem na sua aplicação em imunossensores face às macromoléculas inteiras. Os anticorpos têm propensão para se ligar de forma assimétrica à superfície de imobilização do sensor, o que leva a que muitos apresentem uma orientação que não favorece a ligação ao antígeno, diminuindo a especificidade e reprodutibilidade do sistema. Os fragmentos são simétricos e permitem uma imobilização mais homogênea, com maior propensão ao reconhecimento do antígeno, pois o impedimento estereoquímico é menor<sup>4</sup>.

## 1.5 Malária

### 1.5.1 Doença, transmissão e diagnóstico

A malária é uma doença provocada por um parasita intracelular do género *Plasmodium*. O parasita é um protozoário (eucarionte unicelular) transmitido pela picada de 60 mosquitos fêmea do género *Anopheles* (vetor de transmissão) e que infecta as hemácias do Homem. A malária é provocada por cinco espécies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*. A forma de malária mais mortal é atribuída à espécie *P. falciparum* e é predominante do continente africano. A espécie *P. vivax* é menos perigosa, mas mais disseminada, enquanto as restantes espécies são mais raras<sup>22-24</sup>.

O processo de infeção tem início quando o mosquito se alimenta, injetando esporozoítos de *Plasmodium* na corrente sanguínea do hospedeiro humano (ver Figura 1.7). Uma vez chegados ao fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, multiplicam-se e diferenciam-se em merozoítos. O ciclo de reprodução assexuada tem início quando os merozoítos são libertados para a corrente sanguínea e infetam as hemácias, multiplicando-se no seu interior. Uma fração de merozoítos é libertada das hemácias para a corrente sanguínea e diferencia-se em gametócitos (forma transmissível do parasita). Quando um novo mosquito se alimenta, os gametócitos são ingeridos e diferenciam-se em gâmetas, iniciando o ciclo de reprodução sexuada. Cada gametócito pode dar origem a um macrogâmeta feminino ou até oito microgâmetas masculinos. A fecundação ocorre no intestino do

mosquito, pelo que o zigoto diferencia-se numa forma móvel capaz de penetrar a parede do intestino, formando oócitos. Com o passar do tempo, os oócitos aumentam em tamanho e rebentam, libertando esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito, podendo então iniciar um novo ciclo de infeção<sup>23,24</sup>. Os sintomas da malária surgem ao fim de 10 a 15 dias após a picada do mosquito e incluem febre, dor de cabeça e vómitos, sendo semelhantes aos sintomas de uma gripe. Quando não tratada, a infeção pode conduzir à morte do hospedeiro<sup>25</sup>.

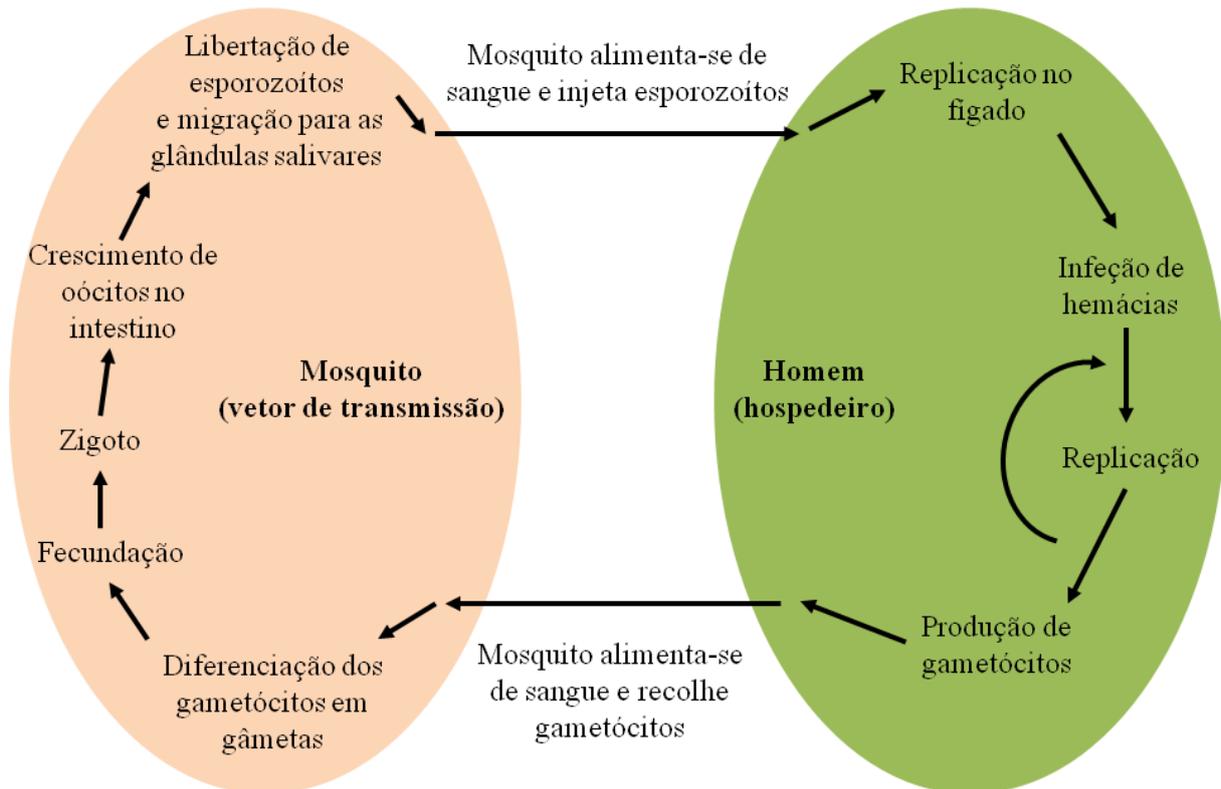


Figura 1.7 – Ciclo de vida do protozoário *Plasmodium sp.*

Os dados da Organização Mundial de Saúde relativos à malária para o ano de 2010 estimam que terão ocorrido 219 milhões de casos (intervalo de 154 a 289 milhões) de pessoas infetadas e 660 mil mortes (intervalo de 610 a 971 mil) confirmadas. No ano de 2011, a estimativa global do número de pessoas em risco de contrair a doença rondou os 3,3 mil milhões, sendo que 80% dos casos verificados e 90% das mortes ocorreram no continente africano, afetando principalmente crianças com menos de 5 anos e mulheres grávidas<sup>22</sup>.

Na atualidade a deteção da malária é feita com recurso a microscopia (ótica ou de fluorescência), testes com recurso a PCR (*Polymerase Chain Reaction*, técnica de deteção ao nível molecular) e testes rápidos de diagnóstico (RDTs – *Rapid Diagnostic Tests*)<sup>26,27</sup>. Das três alternativas possíveis, apenas os

RDTs permitem o diagnóstico de malária em áreas remotas onde não existem condições de suporte, como eletricidade, nem supervisão por técnicos especializados. Os RDTs são dispositivos que detetam antígenos peptídicos produzidos pelo *Plasmodium sp.* presentes no sangue dos pacientes crônicos ou recentemente infectados, num curto intervalo de tempo. A maioria destes dispositivos presentemente disponíveis comercialmente são específicos para a detecção da espécie *P. falciparum*, através do reconhecimento da proteína HRP2 (*Histidine-rich Protein 2*) ou pLDH (*parasite-specific Lactate Dehydrogenase*) presente numa amostra de sangue<sup>26,27</sup>. Os RDTs podem ainda detetar a presença das restantes espécies através da detecção da presença do antígeno Aldolase de *Plasmodium*, comum ao ciclo glicolítico das cinco espécies<sup>27</sup>. Na sua forma mais simples, os RDTs consistem em tiras de nitrocelulose contendo os anticorpos específicos conjugados com um marcador (ex.: nanopartículas de Ouro)<sup>27,28</sup>. O teste baseia-se num princípio imunocromatográfico (ver Figura 1.8). Uma extremidade da tira de nitrocelulose é imersa na amostra biológica líquida (ex.: sangue) que contém o antígeno específico. O líquido percorre a superfície da tira de nitrocelulose por capilaridade, arrastando o antígeno nela contido. Na tira de nitrocelulose existem dois anticorpos que reconhecem dois epítomos distintos do antígeno, sendo que um está conjugado com o marcador e o outro está imobilizado numa superfície sólida. Ao percorrer a tira de nitrocelulose, o antígeno liga-se ao anticorpo conjugado com marcador e o complexo recém-formado é deslocado no sentido do fluxo da amostra, ao longo da tira. O anticorpo imobilizado reconhece o antígeno ligado ao complexo, sendo que há uma acumulação do complexo na região da tira de nitrocelulose onde está imobilizado o anticorpo. A acumulação de marcadores nesta região gera um sinal colorido (formação de uma tira vermelha no caso das nanopartículas de Ouro enquanto marcador). O anticorpo conjugado com o marcador que não ligou antígeno continua a difundir ao longo da tira de nitrocelulose e é capturado por um anticorpo secundário imobilizado mais adiante. À semelhança do sinal gerado para o complexo com antígeno, a acumulação de anticorpo conjugado que não ligou antígeno também gera um sinal colorido, que serve de controlo positivo para a difusão da amostra ao longo da tira de nitrocelulose<sup>27,28</sup>.

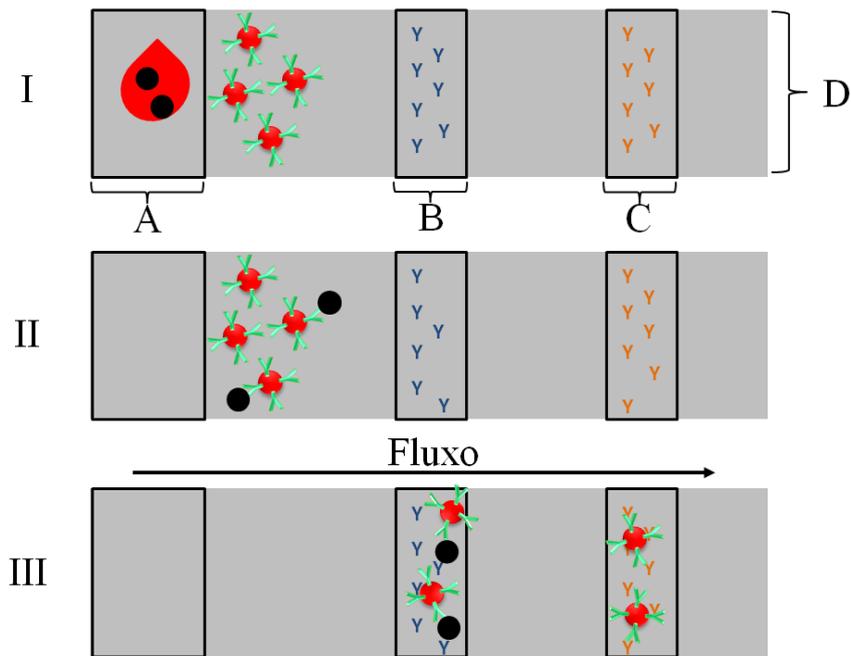


Figura 1.8 – Esquema geral de um RDT. I – a amostra biológica que contém o antígeno (A) é colocada em contato com a tira de nitrocelulose (D). II – ligação do antígeno ao anticorpo conjugado com nanopartículas de Ouro, formando um complexo. III – os complexos difundem pela tira de nitrocelulose e são capturados pelos anticorpos imobilizados na linha de teste (B); os anticorpos conjugados que não ligaram antígeno difundem pela tira de nitrocelulose e são capturados na linha de controle (C). Esquema não está à escala.

Quando as condições de utilização são ideais, os RDTs podem apresentar uma sensibilidade de  $>100$  parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue e fornecer resultados rápidos em apenas 15-20 minutos<sup>27</sup>. Comparativamente, a detecção por microscopia ótica efetuada por um técnico experiente pode apresentar uma sensibilidade entre 50 a 500 parasitas/ $\mu\text{L}$ . A detecção por microscopia de fluorescência apresenta uma sensibilidade inferior a 100 parasitas/ $\mu\text{L}$ . As técnicas de biologia molecular para a detecção de sequências de ácidos nucleicos específicas do parasita são capazes de detetar 5 ou menos parasitas por  $\mu\text{L}$  de sangue, sendo então o mais sensível de todos os métodos disponíveis de diagnóstico de malária. No entanto, os métodos atuais continuam a apresentar dificuldades na sua aplicação prática enquanto ferramentas de diagnóstico. Na Tabela 1.1 estão sumarizados as desvantagens apresentadas por cada método de diagnóstico.

Tabela 1.1 – Resumo das dificuldades apresentadas pelos métodos atuais convencionais para diagnóstico de malária<sup>23,26,27</sup>.

Microscopia	PCR	RDTs
Gera muitos falsos-negativos.	Sujeitos a limitações por parte técnica do operador.	Propensos à deterioração por exposição a temperatura e humidade.
Requer mão-de-obra qualificada.	Custo elevado associado.	Propensos à deterioração devido a falha no fabrico.
Necessita de suportes que não são facilmente encontrados em zonas remotas (eletricidade).	Requerem material e mão-de-obra qualificada.	Sensibilidade do teste depende da técnica do operador.
Resultados têm de ser avaliados por operadores diferentes de forma a resolver situações discordantes.	Deteção é realizada num laboratório, demorando 5 a 8 dias para produzir um resultado.	Falta de confiança na exatidão e fiabilidade do teste.

Para além dos antígenos HRP2, pLDH e Aldolase de *Plasmodium* utilizados nos RDTs, outros antígenos podem ser usados como marcadores etimológicos de *P. falciparum*, como é o caso da proteína PfHsp70 (*Heat Shock Protein 70* de *P. falciparum*).

### 1.5.2 Heat Shock Protein 70 como antígeno de *P. falciparum*

As *Heat Shock Proteins* (HSP) são proteínas altamente conservadas e que existem em quase todas as formas de vida. A sua função consiste em atuar como chaperonas moleculares, ligando-se a proteínas desnaturadas, ajudando no seu processo de enrolamento para a conformação nativa. A *Heat Shock Protein 70* (Hsp70) é uma das maiores famílias de HSP. A expressão de Hsp70 é induzida em resposta a condições de *stress*, geralmente térmico; no entanto, algumas proteínas são expressas de forma constitutiva<sup>29</sup>.

Estruturalmente a Hsp70 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa constituída por três domínios: a) domínio ATPase N-terminal com 45 kDa; b) domínio de ligação do substrato (proteínas) com 15 kDa; c) domínio C-terminal com 10 kDa<sup>29,30</sup>. A Hsp70 induzível do protozoário *P. falciparum* (PfHsp70) contém os três domínios típicos da família e é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasita. Apesar das suas características estruturais, a PfHsp70 ainda não foi caracterizada em termos

das suas propriedades bioquímicas e funções enquanto chaperona<sup>30</sup>. Uma hipótese da sua função enquanto chaperona reside no facto de o ciclo de vida do parasita alternar entre dois habitats distintos – o vetor de transmissão mosquito fêmea (animal de sangue frio) e o hospedeiro humano (animal de sangue quente) –, sendo a expressão de *PfHsp70* em resposta às alterações fisiológicas uma estratégia de sobrevivência empregue pelo protozoário. Outra hipótese da sua função enquanto chaperona relaciona-se com o aumento da temperatura no interior do hospedeiro humano até 41 °C, como resultado da resposta do sistema imunitário.

Em termos da sua utilização como marcador molecular, níveis elevados de *PfHsp70* já foram encontrados no fígado do hospedeiro humano durante a fase de reprodução assexuada do parasita<sup>30</sup>. Desta forma, a *PfHsp70* apresenta-se como uma forte candidata a marcador molecular de *P. falciparum*.

### 1.6 O Sensor proposto – imunobiossensor capacitivo com microelétrodos interdigitais

O sensor proposto neste trabalho consiste num biossensor capacitivo interdigital (IDC) para imunodeteção, constituído por microelétrodos de ouro com configuração interdigital, depositados sobre um substrato de vidro. À superfície dos microelétrodos foi adicionada uma matriz de suporte à imobilização de biomoléculas, constituindo a camada sensível do dispositivo. Quanto à composição da matriz de suporte foram analisadas duas configurações: a) membrana comercial *Immobilon-P* de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) colada sobre os microelétrodos ( $IDC_{PVDF}$ ); b) nanobastonetes de Óxido de Zinco (ZnO) sintetizados diretamente sobre os microelétrodos (ver Figura 1.9) ( $IDC_{ZnO}$ ). Os microelétrodos do sensor  $IDC_{PVDF}$  apresentam uma largura e espaçamento de 50  $\mu\text{m}$ , enquanto os microelétrodos do sensor  $IDC_{ZnO}$  apresentam uma largura e espaçamento de 10  $\mu\text{m}$ . A zona de deteção (sobre os microelétrodos) é dada pela fórmula  $\lambda_{IDC}=2(G+W)$ , onde G e W representam, respetivamente, o espaçamento e largura<sup>13,31</sup>. Para o sensor  $IDC_{PVDF}$ , essa zona (medida na vertical) é de 200  $\mu\text{m}$ , enquanto no sensor  $IDC_{ZnO}$  é de 40  $\mu\text{m}$ . Cada sistema foi analisado por EI de forma a detetar variações na capacidade e impedância, tanto durante a fase de construção do sensor, como no teste da deteção.

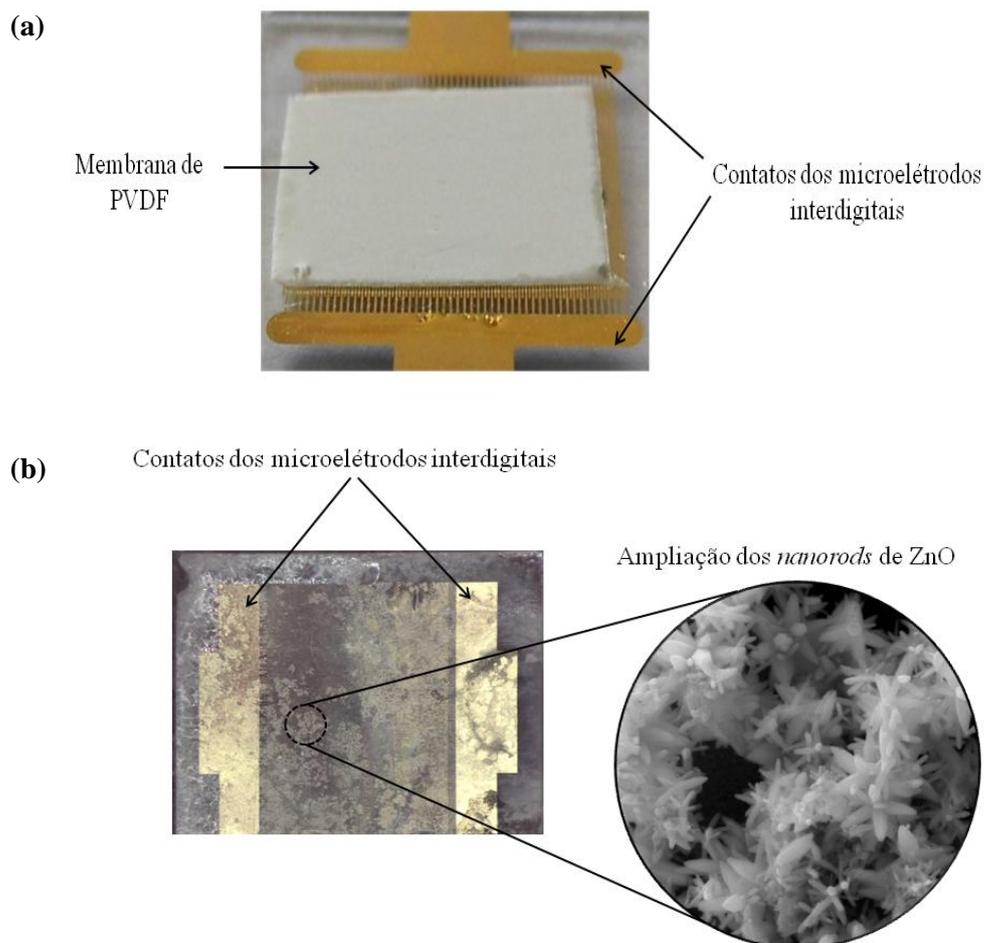


Figura 1.9 – Biossensores capacitivos interdigitais (IDC): a) IDC com membrana de PVDF comercial colada sobre os microelétrodos interdigitais (50  $\mu\text{m}$ ) de Ouro; b) IDC com nanobastonetes de ZnO sintetizados à superfície dos microelétrodos interdigitais (10  $\mu\text{m}$ ) de Ouro (ampliação dos nanobastonetes obtida por SEM).

As camadas constituídas pelas matrizes adicionadas sobre o transdutor, além de fornecerem um suporte à imobilização do biorrecetor, permitem a sua distribuição ao longo da zona de deteção. Desta forma, as alterações registadas pelo sensor serão devidas principalmente à ligação entre o anticorpo e antigénio e não o resultado de alterações na camada localizada sobre a região de imobilização, como acontece com os sensores IDC convencionais, onde a maior parte da região de deteção é ocupada por ar ou meio líquido.

As membranas comerciais de PVDF permitem um processo de imobilização das biomoléculas simples e barato, sobre microelétrodos com dimensões superiores a 50  $\mu\text{m}$ , o que representa uma vantagem sobre os sensores com nanoelétrodos, que requerem processos de fabrico mais dispendiosos e complexos. O PVDF é um polímero hidrofóbico composto por flúor e carbono (ver Figura 1.10) que pode ser utilizado para formar filmes finos com espessura entre 9 a 110  $\mu\text{m}$ , nomeadamente por *spin-coating*. Comercialmente são produzidos filmes com maiores espessuras (0,5 e 1 mm). Os filmes de

PVDF são utilizados frequentemente como filtros e membranas de *Western blott*<sup>32,33</sup>. As membranas de PVDF apresentam elevada afinidade para proteínas, resistência química e elevada força mecânica, podendo ser reutilizadas em imunodeteção<sup>32-34</sup>. A ligação de proteínas às membranas de PVDF é feita por um processo de adsorção física ou fisissorção, resultante de interações hidrofóbicas entre os aminoácidos hidrofóbicos da proteína e os domínios hidrofóbicos do polímero. A imobilização das proteínas é feita ao longo da profundidade da membrana<sup>33</sup>. O polímero de PVDF apresenta ainda um peso reduzido, podendo ser ligado a superfícies sem as alterar ou danificar<sup>32</sup>.

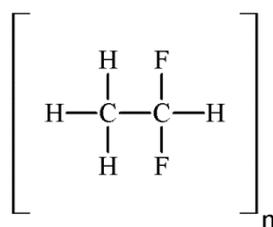


Figura 1.10 – Estrutura química do Fluoreto de Polivinilideno (PVDF).

Os nanobastonetes de ZnO são estruturas semicondutoras com uma das dimensões à nanoescala (1 a 100 nm)<sup>35,36</sup>. Enquanto nanomaterial, o ZnO apresenta uma cinética de transferência eletrônica rápida, um ponto isoelétrico elevado (9,5), uma razão área superficial/volume elevada, estabilidade química, atividade eletroquímica, propriedades piezoelétricas e biocompatibilidade<sup>37-39</sup>. A soma destas propriedades torna as estruturas de ZnO bastante atrativas para a área dos biossensores, nomeadamente como matrizes de suporte à imobilização de proteínas. A imobilização pode ser feita por adsorção física ou por reticulação, usando um ou dois agentes de reticulação (*cross-linkers*) para fazer a ponte entre a proteína e a estrutura metálica<sup>37,38</sup>. Na Figura 1.11 está exemplificada a ligação do anticorpo anti-HRP à superfície da nanopartícula de ZnO por reticulação (procedimento aplicado neste trabalho). O agente de reticulação Sulfo-SMB liga-se ao anticorpo através dos grupos aminas livres (-NH<sub>2</sub>) e ao agente de reticulação MPTMS através do seu grupo tiol (-SH), ligando covalentemente o anticorpo ao ZnO. Este tipo de imobilização não promove qualquer orientação específica do anticorpo, uma vez que os resíduos que contêm aminas (ex.: lisinas) podem estar localizados em grande parte da macromolécula. No entanto, os anticorpos imobilizados segundo este procedimento ainda mantêm uma capacidade de ligação significativa<sup>40</sup>. A facilidade e simplicidade do processo de imobilização referido representa uma vantagem face aos métodos que permitem uma orientação específica dos anticorpos – procedimentos mais complexos, com condições agrestes e elevada perda de anticorpo durante o procedimento. O processo de imobilização de proteínas nos nanobastonetes de ZnO por reticulação é mais complexo face à imobilização nas membranas de PVDF. No entanto, devido à

ligação covalente entre as nanoestruturas e as proteínas, o risco de perda de material biológico é menor durante as lavagens dos sensores nas fases de fabrico e teste.

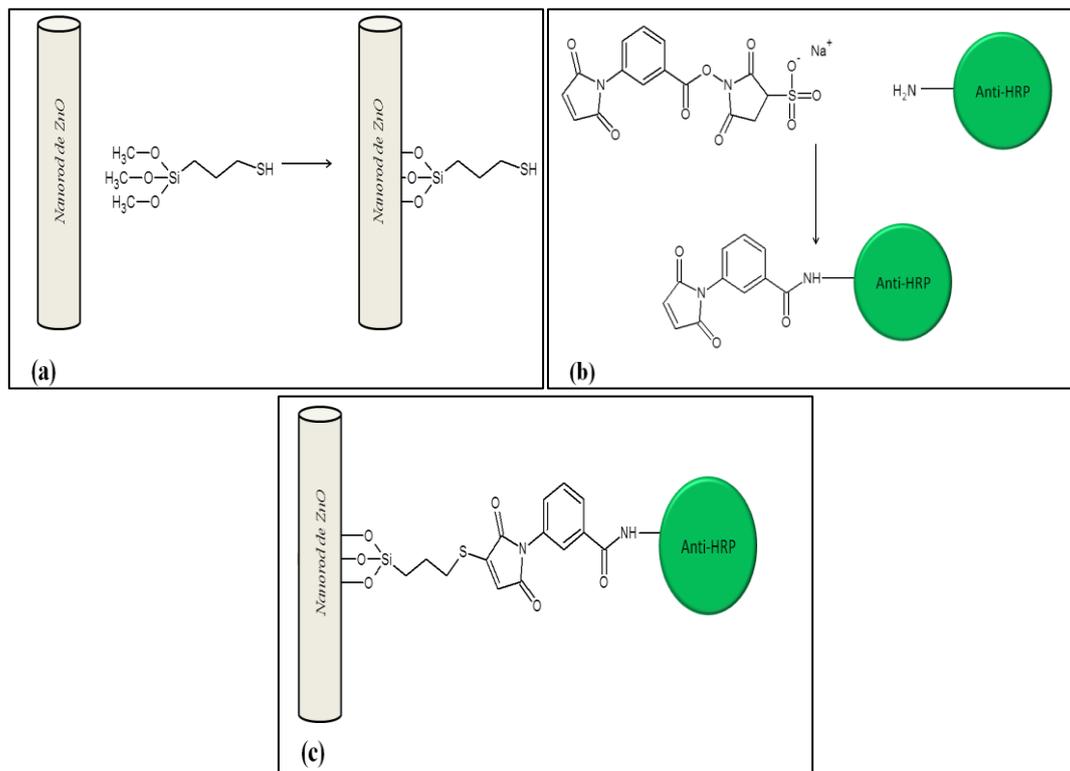


Figura 1.11 – Imobilização do anticorpo anti-HRP sobre nanobastonetes (*nanorods*) de ZnO por reticulação: a) silanização dos nanobastonetes com MPTMS; b) ligação do anticorpo ao Sulfo-SMB; c) imobilização do anticorpo sobre o *nanorod* através da ligação entre o MPTMS e o Sulfo-SMB. Esquema não está à escala.

Como modelos de estudo da interação anticorpo/antígeno, foram utilizados dois conjuntos: a) anticorpo monoclonal anti-*PfHsp70* e *PfHsp70* (marcador molecular de *P. falciparum*) como antígeno; b) anticorpo policlonal anti-HRP e Peroxidase de Rábano (HRP) como antígeno. A HRP representa uma família de enzimas produzidas na raiz do Rábano (*Armoracia rusticana*) que catalisam a redução de muitos substratos (ex.: fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, amins), acoplada à conversão de Peróxido de Hidrogénio em água, com formação de radicais livres. A enzima tem grande utilidade comercial, bem como aplicação na investigação biomédica, sendo vulgarmente utilizada como marcador de sondas em imunoenaios e sensores<sup>5,17,41,42</sup>. No presente trabalho, a utilização de HRP em conjunto com o substrato reativo cromogénico ABTS (ver Figura 1.12) permitiu verificar a sua presença nas matrizes de suporte, razão pela qual a enzima foi escolhida como antígeno modelo.

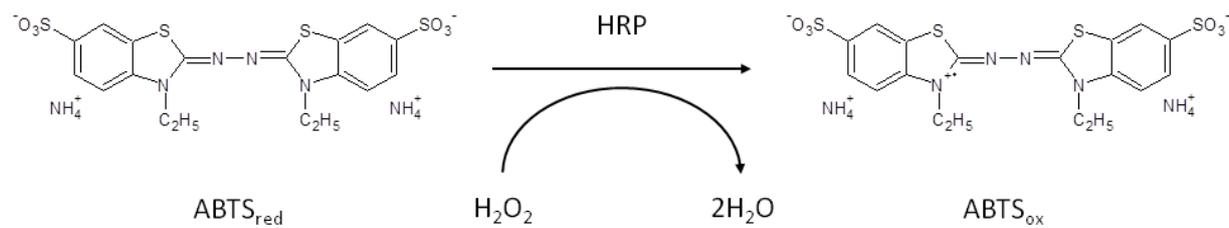


Figura 1.12 – Esquema da reação de oxidação do substrato cromogéneo ABTS, catalisada pela enzima HRP. A oxidação do substrato é concomitante com um aumento da tonalidade verde da solução.

## **CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL**



## 2 Parte Experimental

### 2.1 Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados eram do maior grau de pureza disponível.

2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfónico) (ABTS) (A1888), Ampicilina (A9393), Anticorpo policlonal anti-IgG de ratinho (F9137), Ácido Bicinconínico (BCA) (B9643), Albumina do Soro Bovino (BSA) (A7030), Cloranfenicol (C0378), Glicerol (G789-3), Imidazole (I-0125), Isopropil  $\beta$ -D-1-Tiogalactopiranosida (IPTG) (I5502), Hidróxido de Sódio (S5881), (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS) (175617), Peroxidase de Rábano tipo II (HRP) (P8250), Sulfato de Cobre(II) (4% p/v) (C2284), 2,2,4-Trimetilpentano (32291), Tween® 20 (P1379) e Nitrato de Zinco (96482) foram adquiridos na *Sigma-Aldrich*.

Acetato de Zinco (131775), Ácido Sulfúrico (131058.1212), Burato de Sódio (131644.1211), Estrato de Levedura (403687.1210), Peróxido de Hidrogénio (30% p/v) (121076.124), Cloreto de Sódio (131659.1211), Triptona (403682.1210) e Ureia (131754.1211) foram adquiridos na *Panreach*.

Fosfato de Potássio monobásico (30407), Fosfato de Potássio dibásico (04248) e Cloreto de Potássio (31248) foram adquiridos na *Riedel-de Haën*. Etanol absoluto (4127022) e Trizma™ (Tris) (489983) foram adquiridos na *Carlo Erba Reagents*. Sulfo-MBS (22312) proveio da *Thermo Scientific*. Agar LB (1.10283.0500) proveio da *Merck*. Agarose Ni-NTA proveio da *Qiagen*. Isopropanol foi adquirido na *Scharlau*. Acetona proveio de Valente & Ribeiro, LDA. Anticorpo policlonal para Peroxidase de Rábano (anti-HRP) (ABIN398438) foi adquirido em *antibodies-online*.

Membranas de PVDF *Immobilon-P* (IPVH10100) foram adquiridas na *Merck Millipore*.

Todas as soluções foram preparadas em água desionizada (Mili-Q), salvo indicação contrária.

### 2.2 Procedimentos gerais

#### 2.2.1 Sobreexpressão da *PfHsp70* em *E. coli Rosetta Blue*

Placas de isolamento constituídas por meio Agar LB (3,7% p/v) com Ampicilina (100  $\mu$ g/mL), Cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) e Tetraciclina (12,5  $\mu$ g/mL) foram inoculadas com cultura *stock E. coli Rosetta Blue*, contendo o vetor de expressão pQE30/*PfHsp70*<sup>30</sup>. As placas de isolamento foram incubadas durante 16 horas a 37 °C. Selecionaram-se duas colónias isoladas e inocularam-se 40 mL de meio LB (Triptona 10 g/L, Estrato de Levedura 5 g/L, Cloreto de Sódio 10 g/L) com Ampicilina (100  $\mu$ g/mL), Cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) e Tetraciclina (12,5  $\mu$ g/mL), posteriormente incubados a 210 rpm, durante 16 horas a 37 °C. O inóculo foi diluído em 2 L de meio LB (com antibióticos referidos

anteriormente nas mesmas concentrações) e incubado a 210 rpm e 37 °C, até obter densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) entre 0,5 e 0,6. Neste ponto induziu-se a cultura com IPTG (concentração final 1 mM) e incubou-se a 210 rpm durante 16 horas a 37 °C.

### 2.2.2 Purificação, concentração e quantificação da PfHsp70

A cultura previamente crescida foi centrifugada a  $11305 \times g$  durante 30 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em tampão de lise (Ureia 8 M; Cloreto de Sódio 300 mM; Imidazole 10 mM; Tris 10 mM pH 8; lizosima 1 mM; 800  $\mu$ L de inibidor de protease) com uma pequena quantidade de Dnase. O *pellet* ressuspenso foi levado à *French Press* (*French pressure cell*, Thermo Electron Corporation), com 3 passagens a 2000 psi. O lisado resultante foi centrifugado a  $8228 \times g$  durante 1 hora a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante ao qual adicionaram-se 800  $\mu$ L de inibidor de protease e Glicerol (10% v/v em relação ao volume final).

Misturou-se o sobrenadante com 10 mL de resina Agarose Ni-NTA, previamente equilibrada com tampão de lavagem (Imidazole 10 mM; Cloreto de Sódio 300 mM; Tris 10 mM pH 8), sob agitação suave durante 2 horas a 4 °C. A resina foi transposta para uma coluna cromatográfica e fez-se passar o tampão de lavagem até obter uma  $DO_{280\text{ nm}}$  inferior a 0,1. A partir deste ponto adicionou-se o tampão de eluição (Imidazole 100 mM; Cloreto de Sódio 300 mM; Tris 10 mM pH 8) à coluna até obter uma  $DO_{280\text{ nm}}$  inferior a 0,1.

Procedeu-se à concentração do eluído, recorrendo a *centricons* com um limite de exclusão de 3 kDa (*Amicon® Ultra-4*, Millipore), centrifugando 2 vezes a  $4800 \times g$  durante 15 minutos a 4 °C. A troca do tampão de eluição para tampão Burato de Sódio (Burato de Sódio 150 mM, Cloreto de Sódio 100 mM, pH 8) foi feita nas mesmas condições do passo de concentração.

### 2.2.3 Produção, purificação e concentração do anticorpo anti-PfHsp70

A produção e purificação do anticorpo monoclonal anti-PfHsp70 foram realizadas no Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (Portugal) pela Doutora Cláudia Cunha.

A concentração do anticorpo e troca de tampão Tris-HCl 1M pH 9 para tampão Fosfato de Sódio 20 mM pH 7 foram efetuadas utilizando *centricons* com limite de exclusão de 3 kDa, centrifugando a  $7500 \times g$  em ciclos de 5 minutos a 4 °C.

## 2.2.4 Biossensor capacitivo interdigital com membrana comercial de PVDF

### 2.2.4.1 Eléttodos interdigitais de 50 $\mu\text{m}$ com matriz de imobilizaçãO em PVDF ( $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ )

Os microeletródos interdigitais foram produzidos no Centro de InvestigaçãO de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (Portugal). SãO constituídos por uma dupla camada de Crómio e Ouro (com espessuras de 10 e 40 nm) sobre um substrato de vidro e apresentam uma largura e espaçamento de 50  $\mu\text{m}$  entre pistas, cobrindo uma área de 0,7  $\text{cm}^2$ .

De forma a remover quaisquer impurezas presentes à superfície, os microeléttodos foram lavados com soluçãO Piranha (Ácido Sulfúrico e Peróxido de Hidrogénio numa razãO volumétrica 1:1) durante 15 minutos, seguidos de 3 lavagens de 5 minutos com água Mili-Q. Seguidamente foram secados com Árgon.

Colou-se manualmente uma membrana de PVDF (0,7  $\text{cm}^2$ ; 120  $\mu\text{m}$  de espessura; poros com 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro;) sobre a superfície dos microeléttodos, com uma gota de cola Cianoacrilato (*Ceys*) e deixou-se secar durante 16 horas a 25  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4.2 $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ I – anti-*PfHsp70* imobilizado

#### *ImobilizaçãO de anti-*PfHsp70* nas membranas de PVDF em concentrações diferentes*

Os procedimentos de transferênciA do anticorpo e antigénio foram adaptados do manual da *Merck Millipore*<sup>33</sup>. As membranas de PVDF coladas sobre os eléttodos interdigitais foram submetidas a um pré-tratamento de forma a ficarem hidratadas, que consistiu na lavagem com Isopropanol (50% v/v) durante 15 segundos, seguida de lavagem com água Mili-Q durante 2 minutos e um passo de equilíbriO em tampãO PBS (Fosfato de Potássio monobásico 1,5 mM, Fosfato de Potássio dibásico 7,2 mM, Cloreto de Potássio 2,7 mM, Cloreto de Sódio 137 mM) durante 5 minutos. Seguidamente procedeu-se à imobilizaçãO de anticorpo nas membranas humedecidas, depositando-se 50  $\mu\text{L}$  de soluçãO de anti-*PfHsp70* em tampãO PBS (33, 66 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), durante 1 hora a 25  $^{\circ}\text{C}$ . ApóS a incubaçãO, os biossensores foram lavados com tampãO PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitaçãO manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

#### *Teste da resposta dos biossensores com *PfHsp70* na membrana de PVDF seca*

As membranas de PVDF nãO foram reidratadas, eliminando a necessidade do passo de bloqueamento com BSA<sup>33</sup>. Depositaram-se 50  $\mu\text{L}$  de *PfHsp70* em tampãO PBST (PBS com Tween<sup>®</sup>-20 0,05% v/v) –

concentração de antígeno correspondente ao dobro das moles de anticorpo imobilizado, respetivamente – sobre as membranas durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

#### **2.2.4.3 IDC<sub>PVDF</sub> II – PfHsp70 imobilizado**

##### ***Imobilização de PfHsp70 nas membranas de PVDF em concentrações diferentes***

As membranas de PVDF coladas sobre os elétrodos foram hidratadas (ver secção 2.2.4.2), procedendo-se à imobilização de 50 µL de PfHsp70 em tampão PBS (33, 66 e 100 µg/mL) durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

##### ***Teste da resposta dos biossensores com anti-PfHsp70 na membrana de PVDF seca***

Depositaram-se 50 µL de anti-PfHsp70 em tampão PBST – concentração de anticorpo correspondente ao dobro das moles de antígeno imobilizado, respetivamente – sobre as membranas secas, durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

#### **2.2.4.4 IDC<sub>PVDF</sub> III – teste com HRP em membrana humedecida**

##### ***Imobilização de anti-HRP nas membranas de PVDF e bloqueio com BSA***

As membranas de PVDF coladas sobre os elétrodos foram hidratadas (ver secção 2.2.4.2) e procedeu-se à imobilização de 100 µL de anti-HRP em tampão PBS (100 µg/mL) durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual. Seguidamente depositaram-se sobre as membranas 100 µL de BSA em tampão PBST (0,2% p/v), durante 1 hora a 25 °C. Para remover BSA que não tenha ligado à membrana, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

***Teste da resposta dos biossensores com HRP na membrana de PVDF humedecida (hidrofílica)***

A deposição de antígeno em condições hidrofílicas requereu um pré-tratamento da membrana com Isopropanol (ver secção 2.2.4.2), seguido da deposição de 100 µL de HRP em tampão PBST (59 µg/mL) sobre um dos sensores, à temperatura ambiente durante 1 hora. O controlo foi feito depositando 100 µL de tampão PBST sobre o outro sensor, à temperatura ambiente durante 1 hora. Os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

**2.2.4.5 IDC<sub>PVDF</sub> IV – teste com HRP (antígeno específico) e PflHsp70 (antígeno não específico)*****Imobilização de anti-HRP nas membranas de PVDF e bloqueio com leite em pó***

As membranas de PVDF coladas sobre os eléctrodos foram hidratadas (ver secção 2.2.4.2) e procedeu-se à imobilização de 100 µL de anti-HRP em tampão PBS (200 µg/mL) durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação. As membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó em tampão PBST (5% p/v), durante 1 hora a 25 °C, com agitação. Os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

***Teste da resposta dos biossensores com HRP (antígeno específico) e PflHsp70 (antígeno não específico)***

Antes da deposição dos analitos, as membranas de PVDF sofreram um passo de reidratação (ver secção 2.2.4.2). Procedeu-se à deposição de 100 µL de solução de HRP em tampão PBST (117 µg/mL) e de 100 µL de solução de PflHsp70 em tampão PBST (187 µg/mL), respetivamente, sobre as membranas de dois biossensores, durante 1 hora a 25 °C. Os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

**2.2.4.6 IDC<sub>PVDF</sub> V – fixação da membrana de PVDF com cola epóxi*****Colagem das membranas de PVDF e imobilização de anti-HRP***

Depositou-se uma camada de cola epóxi sobre os eléctrodos por *spin-coating* (500 rpm durante 10 segundos e 2300 rpm durante 1 minuto). As membranas de PVDF foram pressionadas sobre a camada

de cola, seguindo-se um passo de cura de 72 horas, de forma a garantir que a camada de cola secasse completamente.

As membranas de PVDF foram hidratadas (ver secção 2.2.4.2) e procedeu-se à imobilização de 100  $\mu\text{L}$  de anti-HRP em tampão PBS (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), durante 1 hora a 25 °C. Após a incubação, os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação. As membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó em tampão PBST (5% p/v), durante 1 hora a 25 °C, com agitação. Os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

#### ***Teste da resposta dos biossensores com HRP (antigénio específico) e PfHsp70 (antigénio não específico)***

As membranas de PVDF foram reidratadas (ver secção 2.2.4.2) e procedeu-se à deposição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de HRP em tampão PBST (117  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e de 100  $\mu\text{L}$  de solução de PfHsp70 em tampão PBST (187  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respetivamente, durante 1 hora a 25 °C. Os biossensores foram lavados com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação e secados a  $2 \times 10^{-2}$  mbar durante 30 minutos.

#### **2.2.4.7 Espectroscopia de Impedância**

A Capacidade (C) e Tangente de Perdas ( $\text{tg}\delta$ ) foram medidas com um Analisador de Impedância 4294A (Agilent), num intervalo de frequência entre 40 Hz e 110 MHz. Efetuaram-se medições após a colagem da membrana, imobilização do anticorpo e adição do antigénio.

Os biossensores foram colocados dentro da câmara de vácuo, representada na Figura 2.1, até a pressão atingir o nível basal de  $2 \times 10^{-2}$  mbar. A partir deste ponto registaram-se a C e  $\text{tg}\delta$  para cada biossensor. Este foi o procedimento geral de medição, salvo indicação contrária.

No caso do sensor  $\text{IDC}_{\text{PVDF V}}$ , o registo da C e  $\text{tg}\delta$  consistiu em 3 medições à pressão de  $2 \times 10^{-2}$  mbar, alterando a posição de contacto entre as agulhas da ponte e os contactos dos elétrodos interdigitais (ver Figura 2.2) a cada medição.

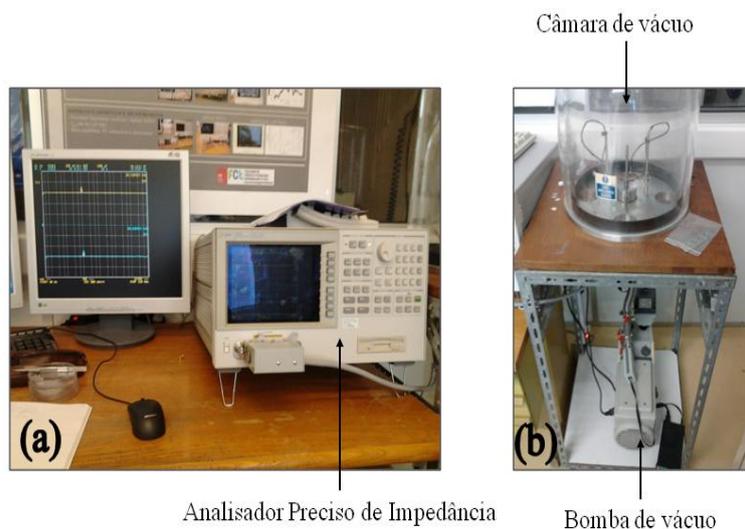


Figura 2.1 – (a) Analisador de Impedância 4294A e (b) câmara de vácuo.

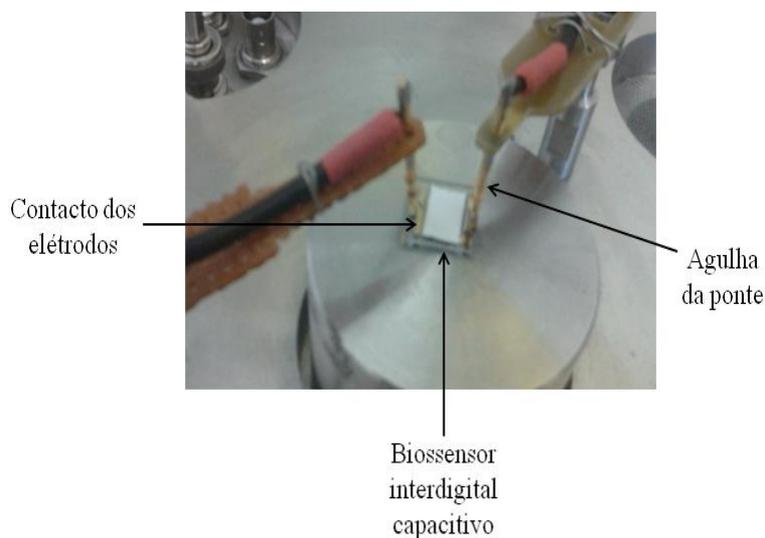


Figura 2.2 – Contacto entre pontas de medição e elétrodos do biossensor capacitivo interdigital no interior da câmara de vácuo.

## 2.2.5 Estudo do suporte de imobilização em PVDF

### 2.2.5.1 Efeito do pré-tratamento da membrana de PVDF com álcool na penetração da solução com antígeno

Uma membrana PVDF com  $1 \text{ cm}^2$  foi hidratada (ver secção 2.2.4.2) enquanto uma segunda membrana, também com  $1 \text{ cm}^2$ , permaneceu seca. As duas membranas foram incubadas com  $100 \mu\text{L}$  de HRP em tampão PBS ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) durante 1 hora a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS durante 5 minutos (3 vezes), sob agitação manual.

A atividade enzimática da HRP imobilizada nas membranas foi medida de acordo com o protocolo estabelecido pela *Sigma-Aldrich*<sup>43</sup>, utilizando ABTS como substrato cromogéneo da peroxidase. As membranas foram colocadas no fundo de uma célula de quartzo onde se adicionaram 2,9 mL de ABTS (9,1 mM) em tampão Fosfato de Potássio monobásico pH 5 (100 mM) e 100 µL de Peróxido de Hidrogénio (0,3% v/v). Acompanhou-se a reação oxidação do ABTS (ABTS<sub>ox</sub>) através da medição do aumento de absorvância a 405 nm, com recurso a um espectrofotómetro UV/Vis UV2 (*UNICAM*) ao longo de 3 minutos, com homogeneização manual da solução de 10 em 10 segundos.

### 2.2.5.2 Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF

Um bloqueio eficiente das membranas de PVDF é essencial para minimizar as interações não específicas entre o analito e os locais disponíveis para ligação no interior da membrana. O bloqueio da membrana assegura que a maioria do sinal produzido pelo sensor resulta da ligação específica do antigénio ao anticorpo. Para determinar as melhores condições de bloqueio efetuaram-se cinco ensaios. Nos ensaios A, B e C analisou-se a utilização de BSA enquanto agente de bloqueio, em duas concentrações – 0,2 e 5% (p/v). Nos ensaios D e E analisou-se a utilização de leite magro em pó como agente de bloqueio à concentração de 5% (p/v).

Um conjunto de 4 membranas de PVDF com 1 cm<sup>2</sup> passou por um pré-tratamento com Isopropanol, tal como descrito na secção 2.2.4.2. O procedimento geral para todos os ensaios consistiu na imobilização do anticorpo anti-HRP na membrana, seguido de um passo de bloqueio e deposição do antigénio HRP em tampão PBST (59 µg/mL nos ensaios A a D; 117 µg/mL no ensaio E) à temperatura ambiente. Entre cada passo efetuaram-se lavagens com tampão PBS. Após deposição do antigénio determinou-se a sua presença nas membranas, segundo o protocolo da *Sigma-Aldrich*, conforme descrito na secção 2.2.5.1, mas a comprimento de onda 424 nm – correspondente a um dos picos de absorção do ABTS oxidado. As especificações dos passos de imobilização do anticorpo, bloqueio e lavagens para cada ensaio encontram-se descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Condições de imobilização do anticorpo, bloqueio e lavagens das membranas de PVDF nos ensaios de otimização do processo de bloqueio.

	<b>Imobilização do anticorpo</b>	<b>Bloqueio</b>	<b>Lavagens</b>
<b>Ensaio A</b>	100 µL de anti-HRP em tampão PBS (100 µg/mL), durante 1 hora.	100 µL de BSA em tampão PBST (0,2 % p/v) durante 1 hora.	5 minutos em tampão PBS sob agitação (3x).
<b>Ensaio B</b>	100 µL de anti-HRP em tampão PBS (100 µg/mL) durante 4 horas.	100 µL de BSA em tampão PBST (0,2 % p/v) durante 16 horas.	5 minutos em tampão PBS sob agitação (3x).
<b>Ensaio C</b>	100 µL de anti-HRP em tampão PBS (100 µg/mL) durante 1 hora.	Solução BSA em tampão PBST (5 % p/v), sob agitação durante 1 hora.	10 minutos em tampão PBS sob agitação (3x).
<b>Ensaio D</b>	100 µL de anti-HRP em tampão PBS (100 µg/mL) durante 1 hora.	Solução leite em pó em tampão PBST (5 % p/v), sob agitação durante 1 hora.	10 minutos em tampão PBS sob agitação (3x).
<b>Ensaio E</b>	100 µL de anti-HRP em tampão PBS (200 µg/mL) durante 1 hora.	Solução leite em pó em tampão PBST (5 % p/v), sob agitação durante 1 hora.	10 minutos em tampão PBS sob agitação (3x).

## 2.2.6 Difusão do antígeno e anticorpo através da membrana de PVDF

A penetração do antígeno e anticorpo na membrana de PVDF é essencial para o sucesso do sensor. Se as biomoléculas não forem capazes de difundir através da membrana, a região de medição do campo elétrico não será capaz de detetar a sua presença e interação. Neste estudo analisou-se a capacidade de difusão do antígeno e anticorpo através da membrana de PVDF.

### 2.2.6.1 Difusão de antígeno através da membrana de PVDF

Depositaram-se 100  $\mu\text{L}$  de anti-HRP em tampão PBS (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre uma membrana de PVDF (1  $\text{cm}^2$ ), hidratada (ver secção 2.2.4.2), durante 1 hora. A membrana foi lavada com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação, e bloqueada com leite em pó em tampão PBST (5% p/v), durante 1 hora sob agitação. A membrana foi lavada novamente com tampão PBS durante 10 minutos (3 vezes), sob agitação, para remover o leite em excesso. Uma segunda membrana de PVDF hidratada foi colocada por debaixo da membrana com anticorpo, de forma a não haver bolhas de ar entre as superfícies de contacto. As duas membranas sobrepostas foram colocadas sobre uma folha de parafilme e depositaram-se 50  $\mu\text{L}$  de HRP em tampão PBS (234  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), assegurando que a gota não ultrapassasse o limite da área da membrana superior. As membranas foram incubadas à RT durante 1 hora e lavadas em seguida com tampão PBS fresco, durante 10 minutos (3 vezes) sob agitação. Registou-se a formação de  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  para cada membrana, segundo o procedimento descrito na secção 2.2.5.2, mas a comprimento de onda 424 nm.

### 2.2.6.2 Difusão de anticorpo através da membrana de PVDF

Duas membranas de PVDF (1  $\text{cm}^2$ ) foram hidratadas (ver secção 2.2.4.2) e colocadas sobre uma folha de parafilme. Depositaram-se 60  $\mu\text{L}$  de anti-IgG marcado com fluoróforo FITC em tampão PBS (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre uma membrana, assegurando que a gota não ultrapassasse o limite da área superficial. O controlo foi feito depositando 60  $\mu\text{L}$  de tampão PBS sem anticorpo na outra membrana hidratada. As membranas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavadas de seguida com tampão PBS fresco, durante 10 minutos (3 vezes) sob agitação. Cada uma das membranas foi cortada ao meio e registou-se a intensidade da fluorescência da secção por microscopia de fluorescência. As imagens obtidas foram analisadas com o *software ImageJ 1.47V* (National Institutes of Health, EUA).

## 2.2.7 Biossensor capacitivo interdigital com nanobastonetes de ZnO

### 2.2.7.1 Deposição de *seeds* de ZnO sobre os elétrodos interdigitais de 10 µm

Os microeletrodos interdigitais foram produzidos no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (Portugal). São constituídos por uma dupla camada de Crómio e Ouro sobre um substrato de vidro e apresentam uma largura e espaçamento de 10 µm entre as pistas.

A deposição prévia de *seeds* de Óxido de Zinco (ZnO) fornece centros de nucleação para o crescimento vertical das nanoestruturas diretamente à superfície do transdutor<sup>44</sup>. O processo de deposição de *seeds* de ZnO consistiu na deposição de uma gota de Acetato de Zinco em Etanol (1,1 mg/mL) sobre os elétrodos, por *spin-coating* (2300 rpm durante 30 segundos). A deposição foi efetuada 4 vezes, deixando o solvente evaporar entre deposições. De forma a decompor o Acetato de Zinco em ZnO, os elétrodos foram submetidos a 250 °C durante 30 minutos. Os processos de deposição por *spin-coating* e decomposição térmica foram repetidos uma vez adicional.

### 2.2.7.2 Crescimento de nanobastonetes de ZnO sobre os microelétrodos interdigitais

Misturaram-se duas soluções de Hidróxido de Sódio (14 mg/mL) e de Nitrato de Zinco (2,97 mg/mL) numa razão volumétrica 1:1, a 700 rpm durante 2 horas a 25 °C, dentro de um reator de vidro (ver Figura 2.3). Os elétrodos foram suspensos dentro do reator, de forma que toda a área superficial das pistas de Ouro estivesse em contacto com a solução agitada. A agitação foi reduzida para 300 rpm e a temperatura dentro do reator foi mantida a 80 °C durante 6 horas. Por fim, os elétrodos foram retirados do interior do reator e deixados a secar durante 30 minutos a 90 °C.



Figura 2.3 – Reator de síntese de nanobastonetes de ZnO com controlo de temperatura e agitação.

### 2.2.7.3 Silanização dos nanobastonetes de ZnO e reticulação do anticorpo anti-HRP

Os elétrodos foram incubados em alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  do agente de reticulação primário MPTMS (2% v/v) em 2,2,4-Trimetilpentano durante 1 hora, de forma a promover a silanização dos nanobastonetes de ZnO. Para remover o MPTMS não ligado os microelétrodos foram lavados com 2,2,4-Trimetilpentano e deixados a secar à temperatura ambiente.

O anticorpo anti-HRP é fornecido em tampão PBS com Azida de Sódio que pode dificultar o processo de reticulação. Para remover a Azida de Sódio procedeu-se à lavagem do anticorpo com tampão PBS em *centricons* de 30 kDa ( $7500 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ).

O anticorpo em tampão PBS ( $3,33 \mu\text{M}$ ) foi incubado com o agente de reticulação secundário Sulfo-MBS ( $33,3 \mu\text{M}$ ) durante 30 minutos. De forma a remover o Sulfo-MBS não ligado efetuou-se um passo adicional de centrifugação da solução em *centricons* de 30 kDa ( $7500 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ).

Depositaram-se 50  $\mu\text{L}$  de solução Sulfo-MBS@anti-HRP em tampão PBS sobre os elétrodos durante 3 horas para promover a ligação do anticorpo aos nanobastonetes de ZnO. Seguidamente, lavaram-se os elétrodos com tampão PBS e procedeu-se ao bloqueio com 50  $\mu\text{L}$  de solução BSA em tampão PBS (5% p/v) durante 2 horas. O excesso de BSA foi lavado com tampão PBS.

#### **2.2.7.4 Teste dos biossensores com HRP (antigénio específico) e *Pf*Hsp70 (antigénio não específico)**

Para testar a resposta dos sensores depositaram-se 50  $\mu\text{L}$  de tampão PBS, HRP em tampão PBS (6,66  $\mu\text{M}$ ) e *Pf*Hsp70 em tampão PBS (6,66  $\mu\text{M}$ ) em três sensores separados durante 1 hora a 25 °C. Seguidamente os sensores foram lavados com tampão PBS.

#### **2.2.7.5 Espectroscopia de Impedância**

A  $C$  e  $\text{tg}\delta$  foram medidas com um Analisador de Impedância 4294A, num intervalo de frequência entre 40 Hz e 110 MHz. Os biossensores foram colocados dentro da câmara de vácuo e registaram-se a  $C$  e  $\text{tg}\delta$  à pressão  $2 \times 10^{-2}$  mbar 3 vezes, alterando a posição de contacto entre as pontes de medição e os contactos dos eléctrodos interdigitais a cada medição. Efetuaram-se medições entre cada passo de construção do sensor, bem como antes e depois da aplicação das soluções sem e com antigénio durante a fase de teste.



**CAPÍTULO 3 – RESULTADOS: APRESENTAÇÃO E  
DISCUSSÃO**



### 3 Resultados: Apresentação e Discussão

#### 3.1 Sensor com membrana comercial de PVDF

A membrana comercial de PVDF, enquanto matriz microporosa de imobilização (ver Figura 3.1), permite uma distribuição das moléculas de anticorpo e antígeno através da região de medição abrangida pelo campo elétrico do transdutor (microelétrodos interdigitais de Ouro). A utilização da membrana na construção do sensor apresenta as seguintes vantagens: a) boa capacidade de retenção e ligação de proteínas; b) não necessitam de agentes de reticulação, pelo que tornam o processo de imobilização mais económico; c) encontram-se amplamente disponíveis no mercado; d) são química e mecanicamente resistentes e termoestáveis<sup>32-34</sup>. As membranas de PVDF usadas neste trabalho apresentam uma espessura de cerca de 120  $\mu\text{m}$ . A altura da região de medida para microelétrodos com 50  $\mu\text{m}$  de espaçamento (G) e largura (W) é dada pela fórmula  $\lambda_{\text{IDC}}=2(G+W)$ , o que resulta numa altura de 200  $\mu\text{m}$ , sendo que 95% das variações medidas ocorre nos primeiros 100  $\mu\text{m}$ <sup>13,31</sup>. Desta forma, a membrana de PVDF encontra-se perfeitamente enquadrada na região de medição.

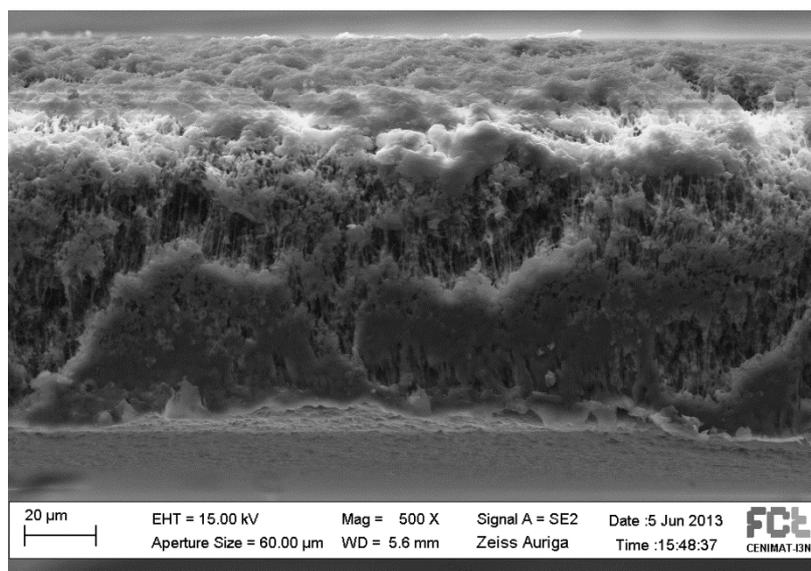


Figura 3.1 – Corte transversal da membrana comercial de PVDF. Imagem SEM realizada no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (CENIMAT, FCT-UNL).

### 3.1.1 Teste do sensor na detecção de *PfHsp70* e anti-*PfHsp70*, enquanto analitos, por EI

A primeira abordagem no desenvolvimento do sensor com membrana comercial de PVDF consistiu na imobilização de 50  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-*PfHsp70* em tampão PBS, à concentração de 33  $\mu\text{g/mL}$ , na membrana de humedecida (IDC<sub>PVDF</sub> I – ver secção 2.2.4.2) A resposta do sensor foi testada na ausência e presença do antígeno com a membrana seca. O teste sem antígeno consistiu na aplicação de 50  $\mu\text{L}$  de tampão PBST seguido do teste com 50  $\mu\text{L}$  de antígeno *PfHsp70* em tampão PBST (31  $\mu\text{g/mL}$ , correspondente ao dobro das moles de anticorpo usado), no mesmo sensor. O princípio de detecção neste sensor está relacionado com a interação específica anticorpo/antígeno. A imunodeteção é feita através da ligação do antígeno *PfHsp70* livre em solução ao anticorpo imobilizado na membrana. Em teoria, a ligação entre as duas moléculas é capaz de provocar uma alteração nas propriedades dielétricas da camada sensível à superfície dos eletrodos. As variações da capacidade e impedância do sistema encontram-se representadas na Figura 3.2.

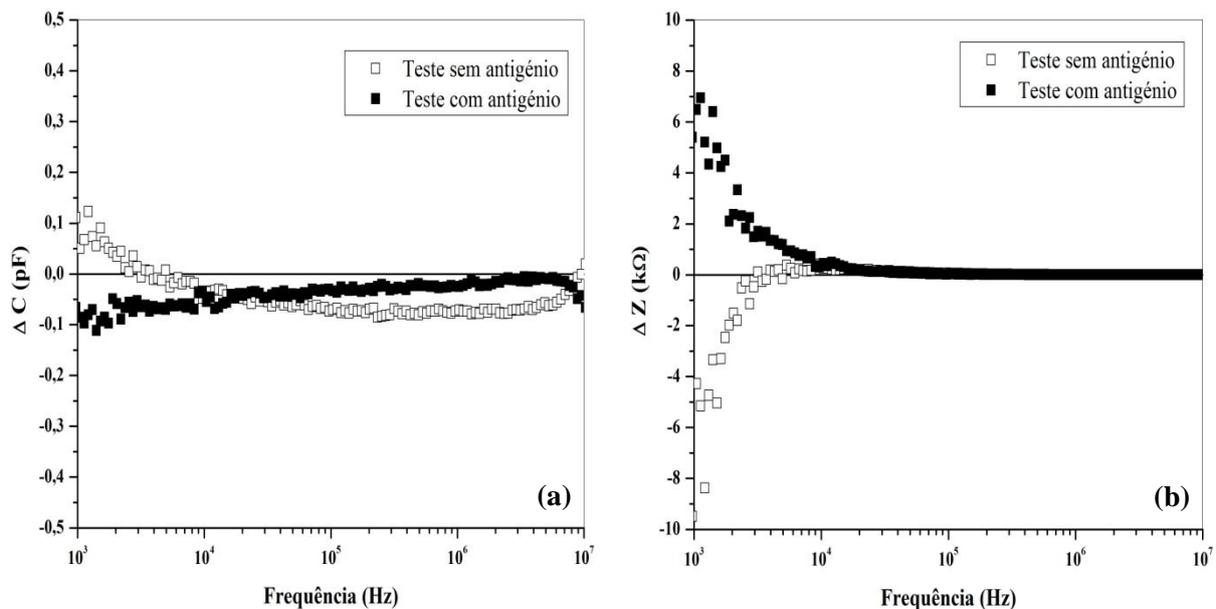


Figura 3.2 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti-*PfHsp70* (33  $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antígeno – aplicação de tampão PBST; teste com antígeno – aplicação de *PfHsp70* em tampão PBST (31  $\mu\text{g/mL}$ ).

O cálculo da variação da capacidade no teste sem antígeno foi efetuado subtraindo a capacidade inicial ao valor da capacidade após a aplicação do tampão PBST. O cálculo da variação da capacidade no teste com antígeno foi efetuado subtraindo a capacidade após a aplicação do tampão PBST ao valor da capacidade após a aplicação do antígeno. Para cada teste, o cálculo da variação da impedância foi efetuado da mesma forma descrita para a capacidade.

A aplicação de tampão PBST produz uma variação decrescente da capacidade com o aumento da frequência, sendo positiva para frequências inferiores 10 kHz. A aplicação do antigénio, por sua vez, produz uma variação contrária da capacidade, completamente negativa e tendendo para 0 para frequências inferiores a 10 MHz. Relativamente à impedância, no teste sem antigénio a variação é negativa para frequências inferiores a 10 kHz, enquanto no teste com antigénio, a impedância varia de forma positiva para as mesmas frequências. O comportamento inverso da impedância relativamente à capacidade é demonstrado pela Equação 10, que define a impedância de um condensador perfeito, onde a impedância ( $Z$ ) é inversamente proporcional à frequência ( $f$ ) e à capacidade ( $C$ )<sup>17</sup>. Desta forma, para o intervalo de frequências entre 1 e 10 kHz, a aplicação do tampão PBST produz uma variação positiva da capacidade e uma variação negativa correspondente da impedância do sistema, verificando-se o comportamento oposto no caso da aplicação do antigénio. No entanto é de notar que as variações de capacidade obtidas neste sensor são baixas, situando-se entre  $\pm 0,1$  pF.

$$Z = \frac{1}{j2\pi fC} \quad (10)$$

A segunda abordagem no desenvolvimento do IDC<sub>PVDF</sub> consistiu no aumento da concentração de anticorpo imobilizado para 66 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , mantendo a proporção de moles de antigénio para as respetivas concentrações. O objetivo consistiu em provocar um aumento da sensibilidade do sistema, disponibilizando um número maior de moléculas de anticorpo e antigénio para produzir um aumento na intensidade da variação da capacidade e impedância, resultante da interação das biomoléculas. Na Figura 3.3 e Figura 3.4 estão representadas as variações da capacidade e impedância para os sensores com 66 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo usado, respetivamente.

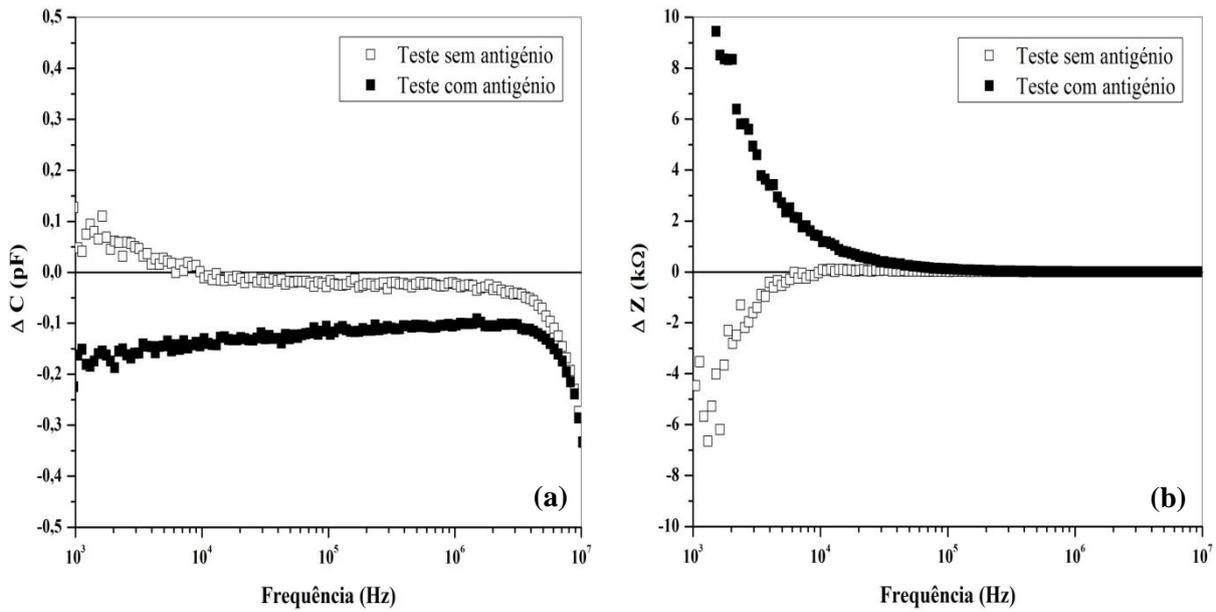


Figura 3.3 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti-*PfHsp70* (66  $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antígeno – aplicação de tampão PBST; teste com antígeno – aplicação de *PfHsp70* em tampão PBST (62  $\mu\text{g/mL}$ ).

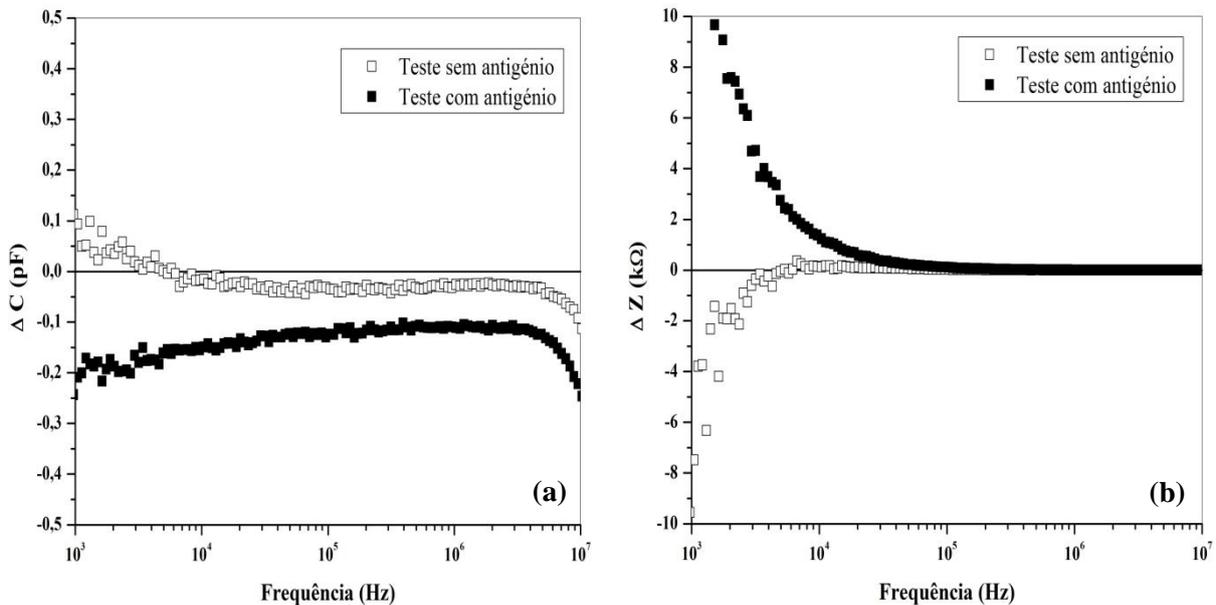


Figura 3.4 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti-*PfHsp70* (100  $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antígeno – aplicação de tampão PBST; teste com antígeno – aplicação de *PfHsp70* em tampão PBST (93  $\mu\text{g/mL}$ ).

Em ambos os sensores (66 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo imobilizado) observa-se um comportamento semelhante da variação de capacidade e impedância. A aplicação de tampão PBST produz uma variação decrescente da capacidade ao longo da frequência, sendo positiva a frequências inferiores a

10 kHz. A aplicação do antígeno produz uma variação negativa crescente da capacidade até 3 MHz, tornando-se seguidamente decrescente. Nos dois sensores, a separação entre as variações de capacidade no teste sem e com antígeno é mais acentuada, uma vez que as duas curvas não chegam a cruzar-se no intervalo de frequências de 1 kHz a 10 MHz, ao contrário do que acontece com a variação da capacidade do sensor de 33  $\mu\text{g/mL}$  à frequência de aproximadamente 20 kHz. No que diz respeito à variação da impedância, o comportamento dos dois sensores (66 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) é bastante semelhante entre si e concordante com o comportamento do sensor de 33  $\mu\text{g/mL}$  – no teste sem antígeno a variação é negativa a frequências inferiores a 10 kHz, enquanto no teste com antígeno a variação é positiva para o mesmo intervalo de frequência.

Para uma melhor comparação da resposta dos três sensores após a ligação do antígeno, está representada na Figura 3.5 a variação da capacidade a 1, 10, 100 e 1000 kHz, para as três concentrações de anticorpo utilizadas.

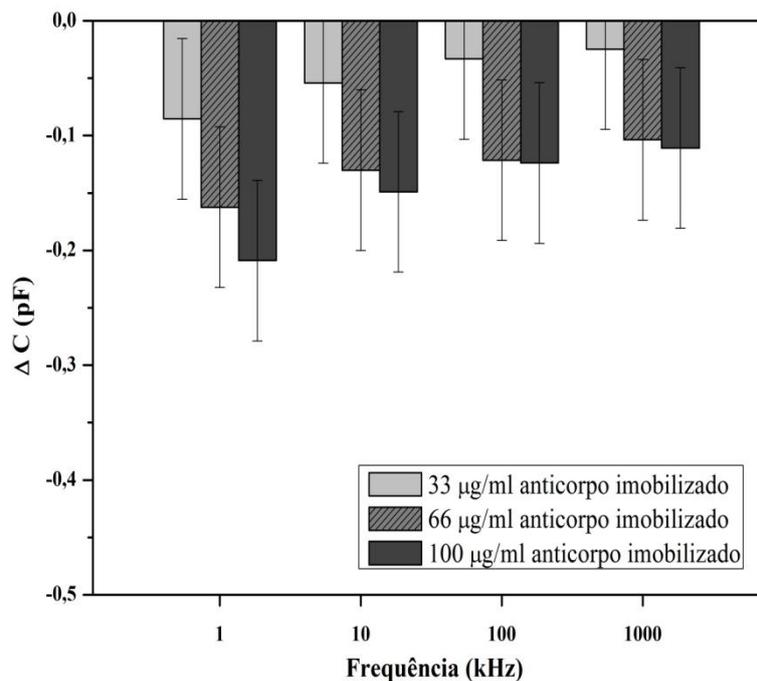


Figura 3.5 – Comparação da variação de capacidade do IDC<sub>PVDF</sub> I, no teste com antígeno, para as concentrações de 33, 66 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo anti-*P/Hsp70* imobilizado na membrana de PVDF.

Como se pode observar pela Figura 3.5, o aumento da concentração de anticorpo de 33 para 66 e 100  $\mu\text{g/mL}$  produz uma diminuição gradual da capacidade. As maiores variações foram obtidas à frequência de 1 kHz, sendo  $-0,08 \pm 88\%$  pF,  $-0,16 \pm 43\%$  pF e  $-0,21 \pm 34\%$  pF para as concentrações de 33, 66 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. A frequência onde se observa maior variação está dentro da

gama ótima de frequências (20 Hz a 6 kHz) para detecção de alterações de capacidade como consequência da ligação entre anticorpo e antígeno<sup>45</sup>. No entanto, é de salientar que as variações obtidas são baixas e com um elevado erro de medição associado, pelo que não se podem tirar quaisquer conclusões quanto às diferenças observadas.

O sensor para imunodeteção foi repetido nas mesmas condições, mas invertendo a ordem das biomoléculas imobilizadas na membrana (IDC<sub>PVDF</sub> II – ver secção 2.2.4.3). A detecção do anticorpo anti-*Pf*Hsp70 neste segundo sensor é feita através da ligação do anticorpo livre em solução ao antígeno imobilizado na membrana. O antígeno *Pf*Hsp70 foi imobilizado às concentrações de 33, 66 e 100 µg/mL, sendo que o anticorpo anti-*Pf*Hsp70 foi adicionado posteriormente à membrana seca. Na Figura 3.6 está representada a variação da capacidade a 1, 10, 100 e 1000 kHz, para as três concentrações de antígeno utilizadas. A variação da capacidade e impedância em resposta ao teste com e sem anticorpo para as três concentrações de antígeno encontram-se no Anexo I.

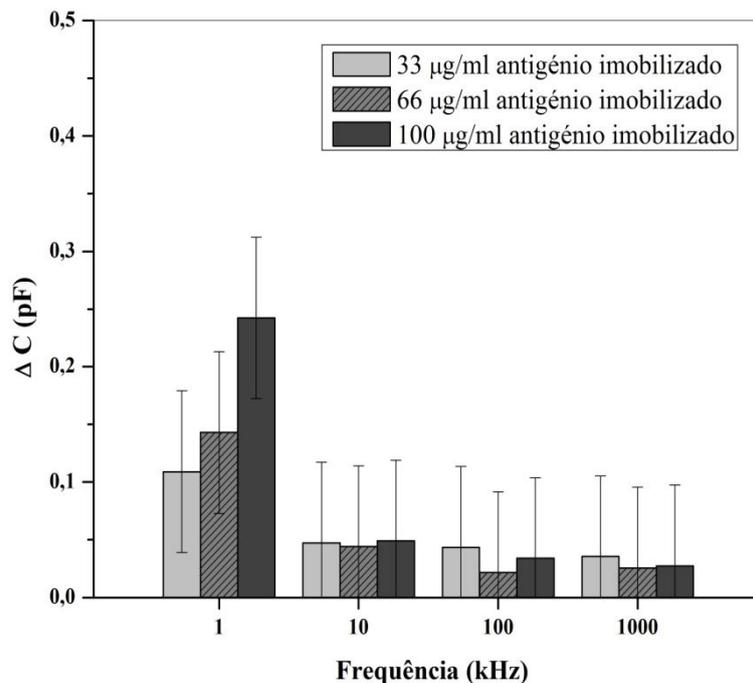


Figura 3.6 – Comparação da variação de capacidade do IDC<sub>PVDF</sub> II, no teste com anticorpo, para as concentrações de 33, 66 e 100 µg/mL de antígeno *Pf*Hsp70 imobilizado na membrana de PVDF.

Na Figura 3.6 observa-se que a variação da capacidade para as três concentrações de antígeno imobilizado é maior à frequência de 1 kHz (0,11 ± 64% pF, 0,14 ± 49% pF, 0,24 ± 29% pF para as concentrações 33, 66 e 100 µg/mL, respetivamente), tal como no sensor IDC<sub>PVDF</sub> I (Figura 3.5). No entanto, neste novo sensor, a variação de capacidade após a adição do anticorpo é positiva, podendo

ser indicativo de que a ligação entre o anticorpo e antigénio tem um efeito simétrico na variação da capacidade do sistema, dependendo de qual dos membros do par se encontra imobilizado na matriz de suporte. Novamente, a frequência onde há maior variação da capacidade está contida na gama ótima de frequências (20 Hz a 6 kHz) para imunodeteção<sup>45</sup>. À semelhança do sensor IDC<sub>PVDF</sub> I, a variação de capacidade para as três concentrações continua a ser baixa e com elevado erro associado, sendo que para as frequências de 10, 100 e 1000 kHz, as variações obtidas são menores ou iguais ao erro da medição.

A aplicação do antigénio ou anticorpo no teste da resposta do sensor (IDC<sub>PVDF</sub> I e II, respetivamente) é feita com a membrana de PVDF seca. Segundo o fabricante, a membrana seca permite ao utilizador desenvolver um método de imunodeteção mais rápido, pois não é necessário um passo prévio de bloqueio das membranas, de forma a minimizar interações inespecíficas das biomoléculas (ex.: ligação do antigénio diretamente à membrana e não ao anticorpo)<sup>33</sup>. No entanto, a membrana de PVDF seca apresenta um comportamento hidrofóbico que pode impedir a difusão das biomoléculas em solução para o seu interior, impedindo que ocorra a ligação entre o anticorpo e antigénio no seio da matriz.

Na secção seguinte é analisado o processo de deposição de antigénio na membrana de PVDF em condições hidrofóbicas e hidrofílicas.

### **3.1.2 Influência do pré-tratamento da membrana de PVDF com álcool na penetração da solução de antigénio através da matriz**

Como foi referido na secção anterior, a membrana de PVDF tem um carácter hidrofóbico que pode condicionar a penetração do antigénio em solução para o interior da membrana. De forma a conferir um carácter hidrofílico, a membrana pode ser tratada previamente com um álcool antes da deposição da solução com antigénio.

Para testar o efeito do tratamento da membrana de PVDF com álcool, imobilizou-se enzima HRP como simulação do antigénio, em duas condições diferentes. Na primeira imobilização, a membrana de PVDF estava completamente seca antes da adição de HRP em tampão PBS, enquanto na segunda imobilização, a membrana de PVDF foi hidratada pela adição de Isopropanol, previamente à adição da solução de antigénio. De forma a detetar a diferença da quantidade de enzima imobilizada nas duas condições, as membranas foram colocadas no fundo de *cuvettes* de quartzo cheias de ABTS (substrato cromogénico) e Peróxido de Hidrogénio (ver secção 2.2.5.1). A enzima HRP catalisa a redução do Peróxido de Hidrogénio a água, com a oxidação acoplada do substrato cromogénico ABTS, resultando num aumento da tonalidade verde da solução<sup>43</sup>. Na Equação 11 está expressa a reação de oxidação do ABTS.



A cinética de oxidação do substrato vai portanto depender da quantidade de enzima imobilizada na membrana. Na Figura 3.7 estão representadas as cinéticas de oxidação do substrato para cada uma das membranas.

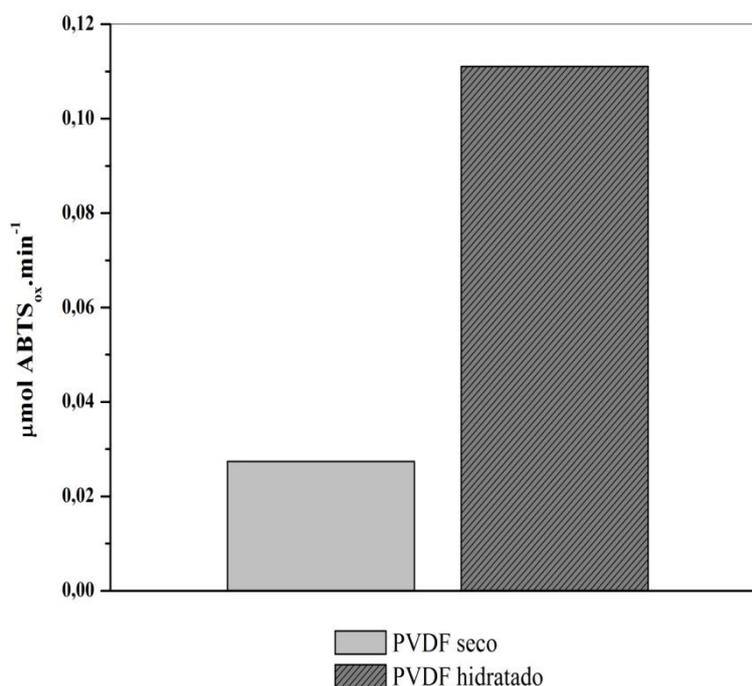


Figura 3.7 – Influência do tratamento prévio da membrana de PVDF na capacidade de penetração da solução de antigénio: PVDF seco – membrana seca (carácter hidrofóbico); PVDF hidratado – membrana tratada previamente com Isopropanol 50% (v/v) e hidratada (carácter hidrofílico).

Como se pode observar pela Figura 3.7, a membrana de PVDF hidratada apresenta uma cinética de oxidação do substrato cerca de 4 vezes superior à cinética da membrana seca, indicando que na membrana hidratada existe uma quantidade de enzima imobilizada que é cerca de 4 vezes superior à enzima presente na membrana seca. Uma explicação para a diferença entre as cinéticas de oxidação apresentadas pelas duas membranas consiste em que na membrana seca, a enzima terá ficado imobilizada apenas na camada superficial da matriz. No caso da membrana hidratada, a solução de HRP terá penetrado no interior da matriz, onde estão disponíveis mais lugares de imobilização.

O resultado da Figura 3.7 indica que o tratamento prévio da membrana com álcool resulta numa maior penetração do antígeno na matriz, arrastado pela respetiva solução que o contém. Com base nesta informação, prepararam-se dois sensores idênticos (IDC<sub>PVDF</sub> III) com anticorpo anti-HRP imobilizado (100  $\mu\text{L}$  de solução 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) numa membrana que foi posteriormente bloqueada com BSA 0,2% (p/v). O teste das soluções foi feito após um passo de reidratação da membrana para promover a penetração das soluções para o interior da matriz. O teste sem antígeno foi efetuado depositando tampão PBST sobre a membrana de um dos sensores, enquanto o teste com antígeno foi feito depositando HRP em tampão PBST sobre o outro sensor. As variações da capacidade e impedância dos dois sensores encontram-se representadas na Figura 3.8.

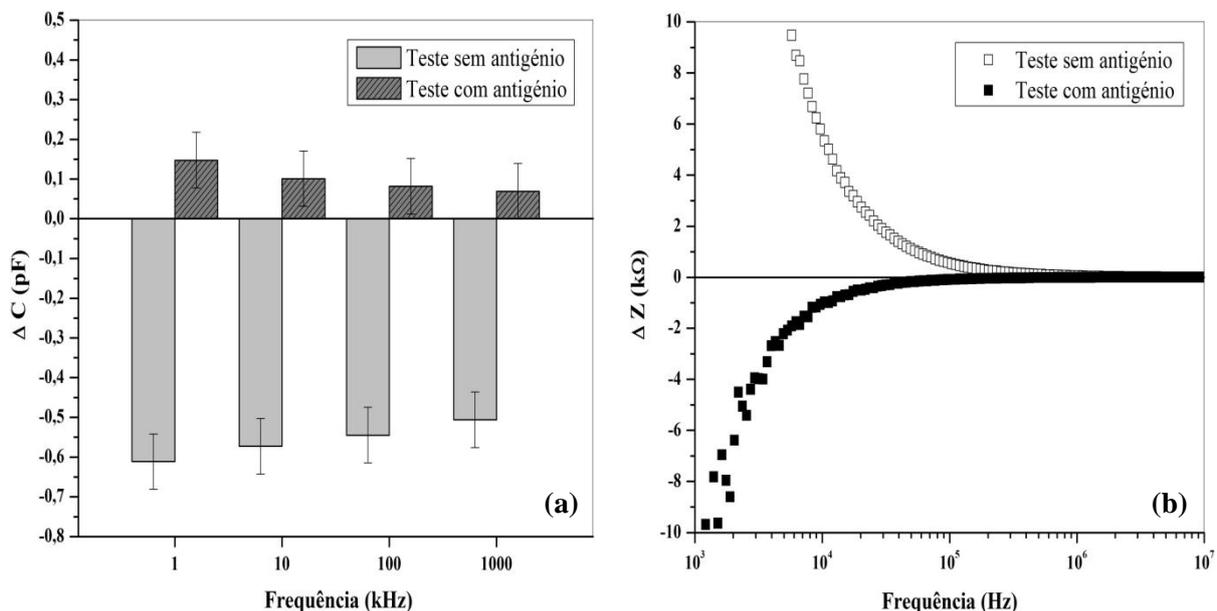


Figura 3.8 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com anticorpo anti-HRP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem antígeno – aplicação de tampão PBST; teste com antígeno – aplicação de HRP em tampão PBST (59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

O cálculo da variação da capacidade em cada situação consistiu na subtração da capacidade inicial ao valor da capacidade após a aplicação da solução teste no respetivo sensor. O cálculo da variação da impedância, para o cada um dos testes, foi efetuado da mesma forma descrita para a capacidade.

Como se pode observar pela Figura 3.8, a aplicação de tampão PBST sem antígeno produz um decréscimo significativo em relação à capacidade inicial do sensor, enquanto a aplicação da solução com antígeno produz um ligeiro aumento da capacidade no intervalo de frequência entre 1 kHz e 1 MHz. Em relação à impedância do sistema, para frequências inferiores a 100 kHz, a aplicação de tampão PBST produz um aumento da impedância, enquanto a aplicação do antígeno em solução

produz um efeito contrário. O comportamento oposto da resposta do sensor nas duas situações, tanto em termos de capacidade, como de impedância, é indicativo de que o sistema é capaz de discriminar entre as duas soluções.

À semelhança dos sensores IDC<sub>PVDF</sub> I e II, a maior variação da capacidade em resposta à presença do antigénio foi obtida à frequência de 1 kHz ( $0,15 \pm 47\%$  pF). No entanto, o valor da variação continua a ser baixo e com erro elevado. Uma vez que a deposição do antigénio foi feita na membrana humedecida, seria espectável um aumento na intensidade da variação da capacidade como resultado da ligação entre o anticorpo imobilizado na matriz e o antigénio, o que não se verificou. Tendo em conta a variação da capacidade produzida pela aplicação do tampão PBST sem antigénio, por exemplo, à frequência de 1 kHz ( $-0,61 \pm 11\%$  pF), observa-se que a solução tampão produz uma variação contrária e mais acentuada em comparação com a variação produzida pelo antigénio. O efeito do tampão na capacidade do sistema foi analisado (ver Figura 3.9) através da construção de dois sensores IDC<sub>PVDF</sub> em bruto (membranas sem proteínas), testando 6 vezes a resposta do sistema à adição de tampão PBST.

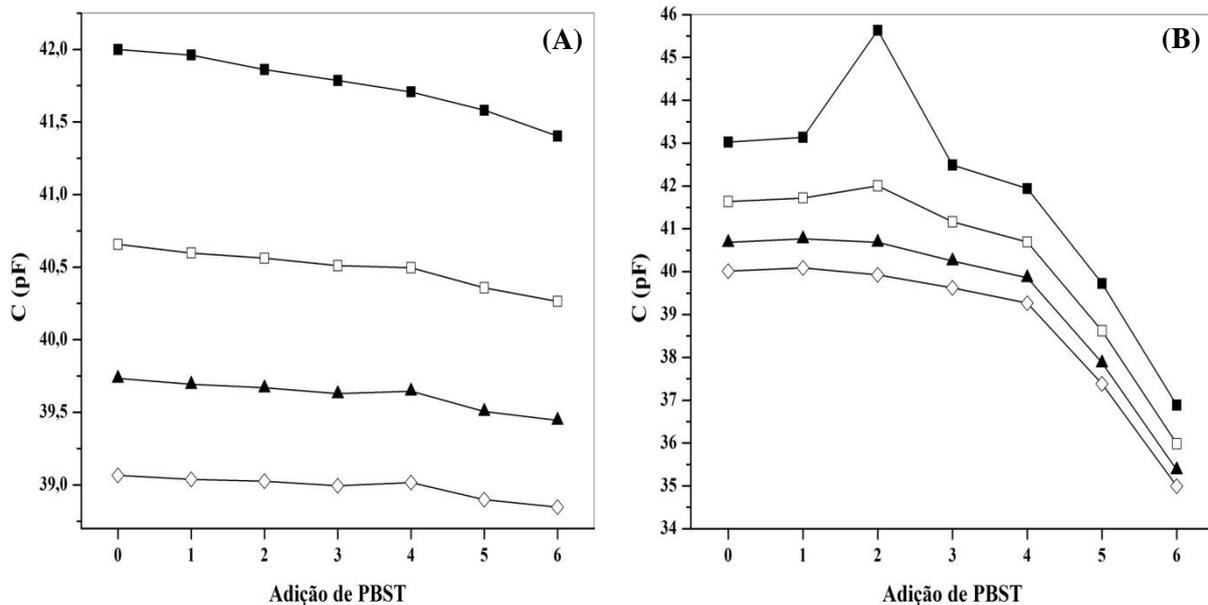


Figura 3.9 – Capacidade nominal de dois sensores IDC<sub>PVDF</sub> (A e B) para as frequências 1 kHz (■), 10 kHz (□), 100 kHz (▲) e 1000 kHz (◇), ao longo de 6 adições de tampão PBST (100  $\mu$ L) sobre a membrana de PVDF sem anticorpo. Entre cada adição de solução as membranas dos sensores foram reidratadas. A adição 0 representa a capacidade inicial do sensor.

Através da Figura 3.9 observa-se que a capacidade dos sensores A e B varia de forma maioritariamente decrescente com as adições sucessivas do tampão PBST. Uma explicação possível para o decréscimo sucessivo da capacidade com a adição de tampão poderá estar relacionada com o

aumento de íons presentes na membrana de PVDF com cada adição de tampão. No Anexo II encontra-se a composição elementar de uma membrana de PVDF tratada com tampão PBST, onde se pode observar a presença vestigial de elementos constituintes do tampão (ex.: P, Cl e Na). Relacionando a informação obtida na Figura 3.8 e Figura 3.9 pode-se inferir que o efeito do tampão na capacidade do sistema poderá estar a mascarar o fenómeno de ligação entre o anticorpo e antigénio, resultando numa baixa variação da capacidade aquando do teste com HRP.

Outra explicação para a baixa variação produzida pelo teste do antigénio está relacionada com o bloqueio da membrana. A utilização da membrana humedecida necessita de um passo de bloqueamento com um agente inerte (neste caso BSA), que não interfira na interação entre o anticorpo e antigénio e ao mesmo tempo ocupe os espaços de ligação vazios dentro da matriz de suporte, minimizando as interações inespecíficas entre o antigénio e a membrana. Na construção do sensor III adicionou-se à membrana de PVDF 0,2% (p/v) de agente de bloqueio, que representa a concentração mínima recomendada pelo fabricante<sup>33</sup>. A concentração usada pode não ser suficiente para bloquear de forma efetiva a membrana, podendo o antigénio estar a ligar-se maioritariamente à membrana e não ao anticorpo.

Na secção seguinte é analisado o processo de bloqueio da membrana de PVDF com vista à sua otimização.

### 3.1.3 Otimização do processo de bloqueio da membrana de PVDF

O bloqueio da membrana de PVDF, como referido anteriormente, é essencial para a minimização das interações inespecíficas entre o antigénio e a matriz, no passo da deteção. A utilização de agentes bloqueantes que ocupam os lugares vazios na matriz, disponíveis para ligação após a imobilização do anticorpo, permite que o antigénio permaneça livre para difundir ao longo da membrana e ligar-se ao respetivo anticorpo. Desta forma, o bloqueio assegura que a variação das propriedades dielétricas sentidas pelo sensor não sejam o resultado de um falso-positivo provocado pela ligação do antigénio à membrana, mas antes o produto da interação entre o antigénio e o anticorpo imobilizado.

Para obter o melhor compromisso entre a natureza e concentração de agente bloqueante, tempo e método do processo, efetuou-se um estudo sobre o processo de bloqueio da membrana de PVDF (ver secção 2.2.5.2). O estudo do bloqueio foi feito com um conjunto de 4 membranas de PVDF hidratadas, com deteção final do antigénio HRP através do registo ótico da oxidação do substrato cromogénico ABTS. No estudo, o controlo negativo consistiu numa membrana bloqueada, sem anticorpo imobilizado e sem adição de antigénio HRP. Este controlo teve como objetivo demonstrar que na ausência do antigénio a cinética de oxidação do substrato é praticamente nula. O controlo positivo consistiu numa membrana não bloqueada, sem anticorpo imobilizado, à qual foi adicionado o

antigénio HRP. O propósito deste controlo consistiu em fornecer uma referência para a totalidade de enzima que fica imobilizada na membrana. A membrana bloqueada sem anticorpo imobilizado e à qual foi adicionado antigénio teve como objetivo fornecer uma noção do papel do agente de bloqueio no impedimento da ligação do antigénio à membrana. A membrana bloqueada e com anticorpo imobilizado teve como objetivo mimetizar as condições das membranas coladas sobre os sensores. Na Figura 3.10 estão representados os resultados do bloqueio com BSA 2% (p/v), durante 1 e 16 horas, bem como o bloqueio com BSA 5% (p/v) durante 1 hora.

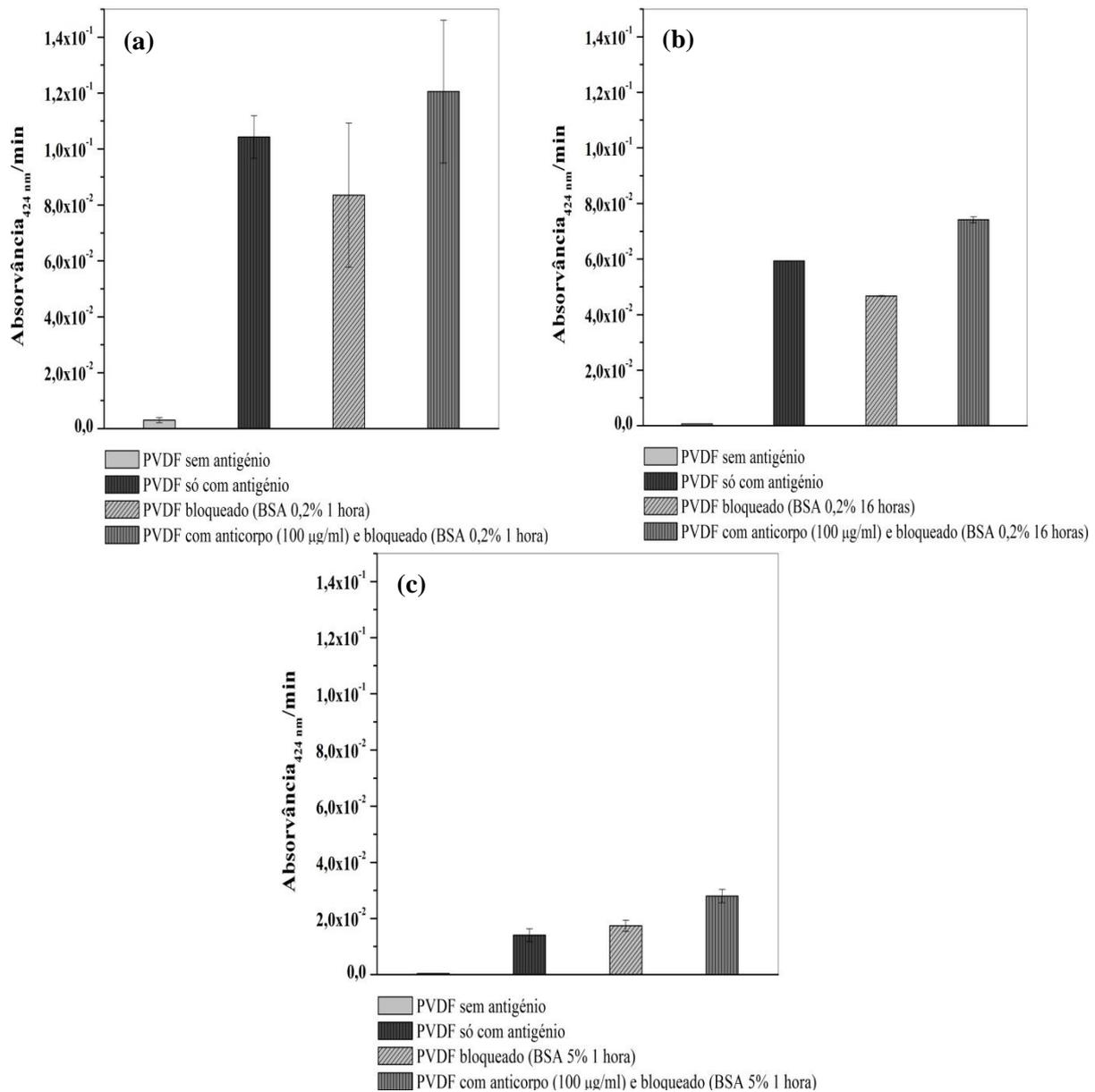


Figura 3.10 – Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF com BSA. Ensaio A – bloqueio com 100 µL de BSA 0,2% (p/v) durante 1 hora (a). Ensaio B – bloqueio com 100 µL de BSA 0,2% (p/v) durante 16 horas (b). Ensaio C – bloqueio com solução de BSA 5% (p/v) durante 1 hora (c). A membrana de PVDF sem antigénio e a membrana de PVDF apenas com antigénio constituem o controlo negativo e positivo, respetivamente. Cada membrana de PVDF foi produzida em duplicado.

O primeiro ensaio (Figura 3.10.a) consistiu na avaliação do bloqueio aplicado no sensor IDC<sub>PVDF</sub> III (ver secção 2.2.4.4), onde a membrana foi bloqueada com 100 µL de solução BSA 0,2% (p/v) durante 1 hora. Comparando a membrana de PVDF apenas bloqueada com BSA com a membrana do controlo positivo observa-se que a cinética de oxidação do substrato é menor para a membrana bloqueada, correspondendo a uma diferença de cerca de 20%. A diferença entre as duas membranas pode ser explicada pela ação da BSA presente na membrana bloqueada, que impediu a ligação de algum antígeno à matriz. Com uma menor quantidade de enzima presente na membrana, a cinética de oxidação do substrato é mais lenta, resultando na diferença observada. A membrana bloqueada com BSA contendo o anticorpo anti-HRP imobilizado apresenta uma cinética de oxidação 15% superior ao controlo positivo. Comparando as duas membranas bloqueadas, com e sem anticorpo, para este ensaio, obtém-se que a presença do anticorpo na membrana é capaz de aumentar a quantidade de antígeno retido no interior da matriz, resultando num aumento da cinética de oxidação em cerca de 35%. Este aumento é provocado pela presença de HRP na membrana que está ligado ao anticorpo. No entanto, é de notar que tanto a cinética da membrana bloqueada sem anticorpo, como a cinética da membrana bloqueada com anticorpo, têm um erro associado de 30% e 20%, pelo que o bloqueio não pode ser considerado eficaz.

O segundo ensaio (Figura 3.10.b) teve como objetivo averiguar o efeito do tempo de incubação do bloqueio da membrana. O bloqueio foi feito com uma gota de 100 µL de solução BSA 0,2% (p/v) sobre as membranas, durante 16 horas. A incubação do anticorpo sobre a membrana teve a duração de 4 horas, para averiguar se o aumento do tempo de contacto entre a solução com anticorpo e a membrana teria efeito na cinética de oxidação medida posteriormente. Comparando a membrana apenas bloqueada com BSA, durante 16 horas, com o controlo positivo observa-se que a cinética de oxidação do substrato é menor para a membrana bloqueada, correspondendo a uma diminuição de 21%. A diferença obtida entre a membrana bloqueada e o controlo positivo no ensaio B não sofreu melhoria quando comparada com a mesma diferença para o ensaio A, demonstrando que para BSA 0,2% (p/v) um bloqueio de 1 hora é suficiente. A membrana bloqueada com BSA (16 horas) contendo o anticorpo anti-HRP imobilizado (4 horas) apresenta uma cinética de oxidação 25% superior ao controlo positivo. Comparando as duas membranas bloqueadas, com e sem anticorpo, para este ensaio, obtém-se que a presença do anticorpo na membrana resulta num aumento da cinética de oxidação em cerca de 46%, como consequência do antígeno ligado ao anticorpo. Comparando a variação das mesmas membranas para o ensaio A, observa-se que o aumento do tempo de imobilização do anticorpo produziu um aumento de 10% da cinética de oxidação. Por questão prática do fabrico do sensor, decidiu-se manter o tempo de imobilização do anticorpo em 1 hora.

No terceiro ensaio (Figura 3.10.c) com BSA optou-se por aumentar a concentração do agente bloqueante para o máximo recomendado pelo fabricante. As membranas foram colocadas numa solução de BSA 5% (p/v), com agitação, de forma a garantir que toda a superfície das membranas

estaria em contato com o agente bloqueante. O tempo de lavagem das membranas após cada tratamento foi duplicado, de forma a garantir que a BSA em excesso não estivesse a bloquear a entrada dos poros, impedindo a difusão do antigénio para o interior da membrana. Analisando a diferença entre a membrana bloqueada sem anticorpo e o controlo positivo, observa-se que a primeira apresenta uma cinética superior face ao controlo positivo. Este resultado pode ser indicativo de que o bloqueio não tenha sido bem-sucedido para a primeira membrana. Por outro lado, o facto de o controlo positivo apresentar uma cinética inferior pode estar relacionado com o carácter hidrofóbico da membrana de PVDF. Durante a preparação das membranas, o pré-tratamento com Isopropanol pode ter sido insuficiente no caso das membranas controlo. Uma parte da matriz pode ter mantido o seu carácter hidrofóbico, dificultando a difusão da solução de antigénio para o interior da membrana, resultando numa menor quantidade de HRP presente.

Nos três ensaios com BSA enquanto agente de bloqueio, não foi possível obter um bloqueio completamente eficaz da membrana. Um bloqueio ideal teria sido indicado por uma cinética da membrana bloqueada sem antigénio o mais próximo de 0 possível, indicando que o maior número possível de lugares disponíveis para ligação da matriz estaria ocupado pela BSA. Como alternativa à BSA, aplicou-se leite em pó magro como agente bloqueante nas membranas. O leite enquanto agente de bloqueio representa uma solução coloidal rica em proteínas de diversos tamanhos, que poderão ocupar mais facilmente diversos locais de ligação no interior da matriz<sup>20,46,47</sup>. Na Figura 3.11 estão representados os resultados do bloqueio com leite em pó 5% (p/v), durante 1 hora, para duas concentrações de anticorpo imobilizado – 100 e 200 µg/mL.

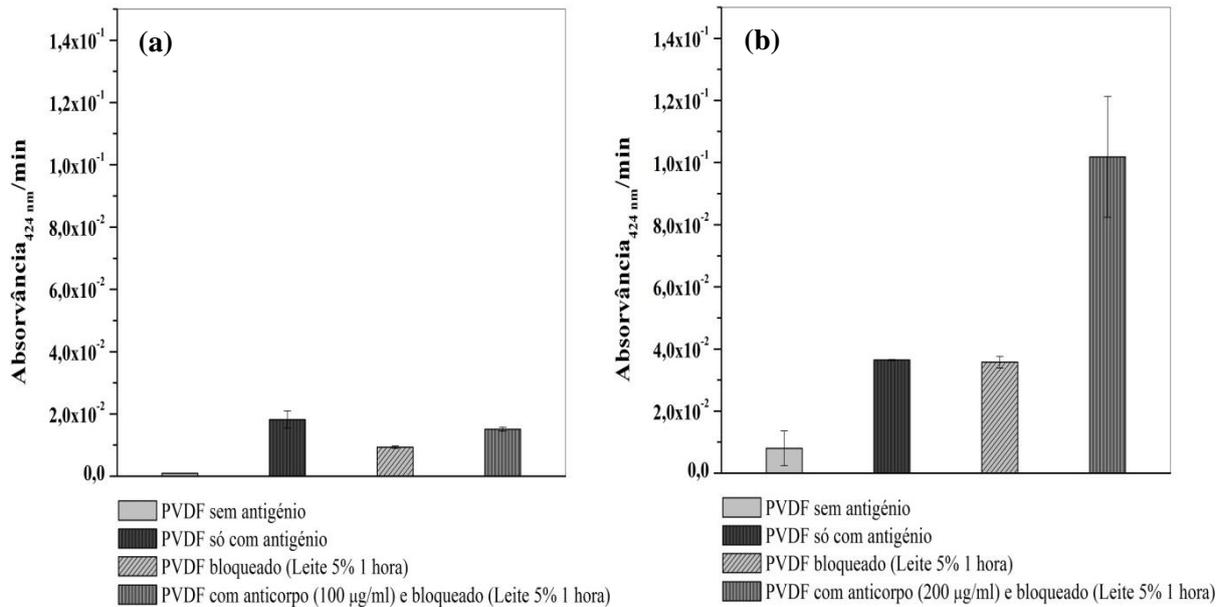


Figura 3.11 – Otimização do processo de bloqueio das membranas de PVDF com leite em pó. Ensaio D – bloqueio com solução de leite em pó 5% (p/v) durante 1 hora (a). Ensaio E – bloqueio com solução de leite em pó 5% (p/v) durante 1 hora e aumento da concentração de anticorpo imobilizado para 200 µg/mL (b). A membrana de PVDF sem antígeno e a membrana de PVDF apenas com antígeno constituem o controlo negativo e positivo, respetivamente. Cada membrana de PVDF foi produzida em duplicado.

Em ambos os ensaios, as membranas foram colocadas numa solução de leite em pó 5% (p/v), com agitação, de forma a garantir que toda a superfície das membranas estaria em contato com o agente bloqueante. Como se pode observar pela Figura 3.11.a, a cinética de oxidação da membrana bloqueada sem anticorpo corresponde a cerca de metade da cinética do controlo positivo. A cinética da membrana com anticorpo difere em 17% do controlo positivo. Quando comparados com os resultados dos ensaios com BSA, os resultados do ensaio D são indicativos de que o leite em pó permite um bloqueio das membranas mais eficaz. A cinética da membrana com anticorpo é inferior ao controlo positivo, o que não sucede nos ensaios com BSA. Num bloqueio ideal, o controlo positivo deverá ter o maior sinal das três membranas, pois tem o maior número de locais disponíveis para ligação desocupados no interior da matriz. A membrana com anticorpo e bloqueada deverá ter um sinal inferior ao controlo positivo, indicando que o sinal produzido pelo antígeno (enzima HRP) é referente apenas à porção que conseguiu ligar ao anticorpo.

O ensaio D demonstrou que o leite em pó foi mais eficaz a bloquear a membrana. De forma a aumentar a contribuição do anticorpo no sinal produzido, mas mantendo o efeito do bloqueio, no ensaio E optou-se por duplicar a concentração do anticorpo e antígeno, mantendo a condição do bloqueio aplicada no ensaio D. Pela Figura 3.11.b observa-se que duplicando a concentração do antígeno HRP aplicado na membrana anula o efeito do bloqueio com leite, uma vez que as cinéticas do controlo positivo e da membrana bloqueada sem anticorpo diferem em apenas 1%. Os resultados do

ensaio D para as mesmas membranas indicam que o bloqueio com leite é eficiente, pelo que a pequena diferença demonstrada no ensaio E pode ser explicada pela retenção de antigénio nos poros da membrana. No entanto, o sinal produzido pela membrana com anticorpo é cerca de 3 vezes maior do que o controlo positivo, representando a maior contribuição do anticorpo na ligação do antigénio obtida nos cinco ensaios realizados.

Das cinco condições testadas nesta secção, seleccionaram-se as condições do ensaio E para os restantes sensores. As condições do ensaio E representam um compromisso entre o bloqueio da membrana e a quantidade de biomoléculas disponíveis para interagir no interior da matriz.

Após a seleção das condições para o bloqueio dos próximos sensores, avaliou-se a questão da difusão do anticorpo e antigénio ao longo das membranas, de forma a assegurar que as biomoléculas atravessam a matriz em toda a sua extensão.

#### **3.1.4 Difusão do anticorpo e antigénio através da membrana de PVDF**

Para avaliar a distribuição do anticorpo ao longo da membrana após o processo de imobilização, aplicaram-se 60  $\mu$ L de solução de anticorpo conjugado com fluoróforo FITC sobre uma membrana de PVDF, durante 1 hora. A membrana foi analisada de seguida no microscópio confocal. Como referência foi utilizada uma membrana de PVDF sem anticorpo. Na Figura 3.12 está representada a intensidade de fluorescência ao longo do corte transversal das duas membranas.

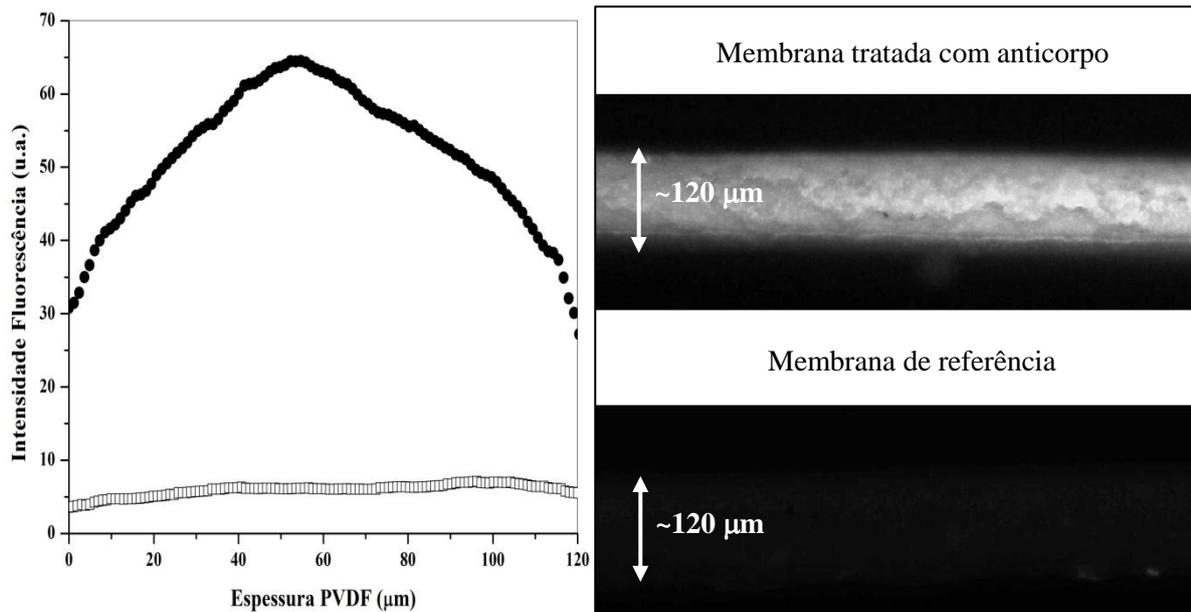


Figura 3.12 – Determinação da distribuição do anticorpo através da membrana de PVDF após o processo de imobilização. Membrana de referência (□) – fluorescência de fundo da membrana de PVDF. Membrana tratada com anticorpo (●) – fluorescência emitida pelo fluoróforo FITC conjugado com o anticorpo anti-IgG de rato.

Comparando a intensidade da fluorescência das duas membranas, observa-se que a membrana incubada com anticorpo apresenta uma intensidade de fluorescência muito superior à membrana de referência. A intensidade da fluorescência em ambas as extremidades da membrana com anticorpo é cerca de 6 vezes superior à intensidade da membrana de referência. Este valor indica que a solução de anticorpo aplicada no topo da membrana difundiu com sucesso até à extremidade oposta. O máximo da intensidade presente a cerca de metade da espessura da membrana (60  $\mu\text{m}$ ) pode ser um artefacto produzido pela rugosidade da superfície do corte transversal, como pode ser observado na imagem da membrana com anticorpo da Figura 3.12. Por esta razão, a região central do corte transversal não deve ser interpretada como sendo o local de maior concentração de anticorpo. O presente ensaio demonstra que o anticorpo está presente ao longo de toda a espessura da membrana de PVDF, sendo portanto abrangido pelo campo elétrico produzido pelos microelétrodos do sensor  $\text{IDC}_{\text{PVDF}}$ .

A difusão do antígeno através da membrana foi determinada através da deposição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de HRP sobre uma membrana com anticorpo anti-HRP imobilizado e bloqueada com leite em pó 5% (p/v) – ver secção 2.2.6.1. A deteção do antígeno foi feita seguindo o pico de oxidação do ABTS a 424 nm. Na Figura 3.13 estão representados os resultados da penetração do antígeno ao longo da membrana de PVDF.

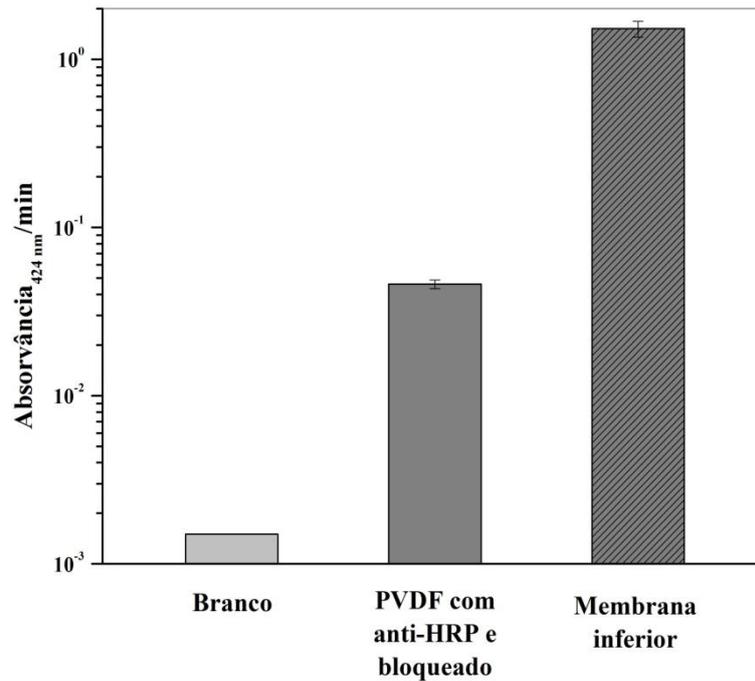


Figura 3.13 – Difusão do antígeno HRP através da membrana de PVDF com anticorpo anti-HRP imobilizado e bloqueada com leite em pó 5% (p/v). Uma segunda membrana de PVDF, não tratada, foi colocada sob a membrana com anticorpo, de forma a captar o antígeno que atravessasse completamente a membrana superior.

Uma boa penetração do antígeno na membrana é essencial para o sucesso do sensor, pois caso contrário não haverá interação entre o par anticorpo/antígeno capaz de ser detectada na região de medição do campo elétrico. Os resultados da Figura 3.13 demonstram que a solução de HRP atravessou com sucesso a membrana de PVDF (com anticorpo e bloqueada), chegando até à membrana inferior. Pela diferença das cinéticas apresentadas pelas duas membranas, observa-se que a maioria do antígeno ficou retida na membrana inferior. Esta diferença poderá ser explicada pela ação do leite enquanto agente bloqueante, que compete com o antígeno pelos lugares de ligação disponíveis na matriz, permitindo que este apenas se ligue ao anticorpo ou continue o seu trajeto de difusão ao longo da membrana. Os resultados tanto da Figura 3.12, como da Figura 3.13, demonstram que o anticorpo e antígeno são capazes de difundir ao longo de toda a espessura da membrana, pelo que estarão perfeitamente localizados dentro da região de medição do campo elétrico gerado pelos microelétrodos do sensor. Com base nesta informação construíram-se mais três sensores IDC<sub>PVDF</sub> nas condições do ensaio E (ver secção anterior), com vista à deteção do analito/antígeno específico, HRP. Os resultados obtidos são apresentados e analisados na secção seguinte.

### 3.1.5 Detecção do analito específico HRP

Após os ensaios de otimização do bloqueio e avaliação da penetração do par anticorpo/antigénio na membrana de PVDF, fabricaram-se três sensores ( $IDC_{PVDF}$  IV) contendo anticorpo anti-HRP para testar a resposta da variação de capacidade nas condições do ensaio E da secção 3.1.3 (ver Figura 3.14.): i) ausência de antigénio, aplicando somente tampão PBST sobre a membrana; ii) presença do antigénio HRP; iii) presença de um antigénio que não tem epítomos reconhecidos pelo anticorpo, tendo sido utilizada a proteína *PfHsp70* para o efeito.

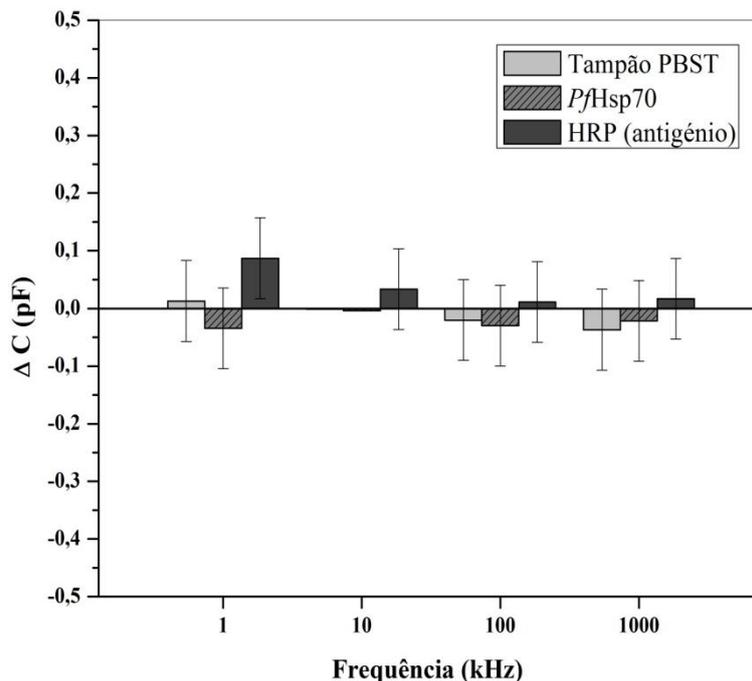


Figura 3.14 – Comparação da variação de capacidade do  $IDC_{PVDF}$  IV, para membranas com o anticorpo anti-HRP testadas na ausência de antigénio (tampão PBST), na presença de antigénio HRP (antigénio específico) e teste com *PfHsp70* (antigénio não específico). O anticorpo anti-HRP (200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) foi imobilizado nas membranas, com bloqueio posterior com leite em pó 5% (p/v). Sobre os respetivos sensores foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de solução de HRP (117  $\mu\text{g/mL}$ ) ou de *PfHsp70* (187  $\mu\text{g/mL}$ ).

As variações de capacidade apresentadas na Figura 3.14 indicam que o sensor não foi capaz de distinguir com sucesso as três soluções aplicadas. Para as quatro frequências analisadas, as variações obtidas para o teste sem antigénio (tampão PBST) e *PfHsp70* (antigénio não específico) são inferiores ao erro da medição. O mesmo verifica-se para o teste com antigénio HRP (antigénio específico) onde, com exceção da frequência 1 kHz, todas as variações obtidas são inferiores ao erro associado. A presença do antigénio na membrana do sensor foi confirmada através da deposição de solução do substrato ABTS sobre o sensor (ver Anexo III). Ao fim de 3 minutos, a membrana adquiriu um tom verde, indicando a oxidação do substrato pela enzima presente na membrana. O controlo foi feito

depositando a mesma solução sobre a membrana do sensor com *PfHsp70*. Nesta membrana não se observou qualquer alteração de cor, pelo que o substrato não foi oxidado.

Com base nos resultados da Figura 3.14, as condições aplicadas no sensor IDC<sub>PVDF</sub> IV não foram bem-sucedidas na produção de um aumento do sinal correspondente à interação do par anticorpo/antigénio, apesar do aumento da concentração de anticorpo imobilizado e antigénio aplicado. Na secção 3.1.2 foi demonstrado que a aplicação de tampão PBST produz uma diminuição acentuada da capacidade do sistema. No entanto, a diminuição não se verificou no caso do sensor IDC<sub>PVDF</sub> IV, uma vez que as variações obtidas são inferiores ao erro associado, não podendo ser consideradas significativas. Uma possível explicação para os resultados obtidos pode estar relacionada com o processo de fabrico do próprio sensor. A fixação da membrana sobre o transdutor é feita de forma manual, sem um controlo preciso da espessura de cola utilizada. Sendo o sistema de medição utilizado sensível a variações que ocorrem à superfície do transdutor, o controlo da espessura da interface entre os microelétrodos e a membrana é essencial para um adequado funcionamento do sensor com boa reprodutibilidade.

### 3.1.6 Fixação da membrana de PVDF sobre o transdutor, mediada por um filme de cola epóxi

A deposição de um filme de cola com espessura controlada pode ser facilmente conseguida através de *spin-coating*. No entanto, a cola utilizada até este momento (Cianoacrilato) não é indicada para uma deposição por *spin-coating*, pois seca rapidamente durante o processo de fabrico do filme, impossibilitando a fixação posterior da membrana.

Como alternativa à cola de Cianoacrilato optou-se por produzir um filme de cola epóxi por *spin-coating*, com o propósito de uniformizar e diminuir a espessura da camada de cola para os sensores fabricados. Os três sensores foram reproduzidos nas mesmas condições, utilizando a camada de cola epóxi para fixar a membrana à superfície dos microelétrodos (IDC<sub>PVDF</sub> V – ver secção 2.2.4.6). Na Figura 3.15 estão representadas as variações de capacidade para a ausência e presença do antigénio HRP e presença do analito não específico *PfHsp70*.

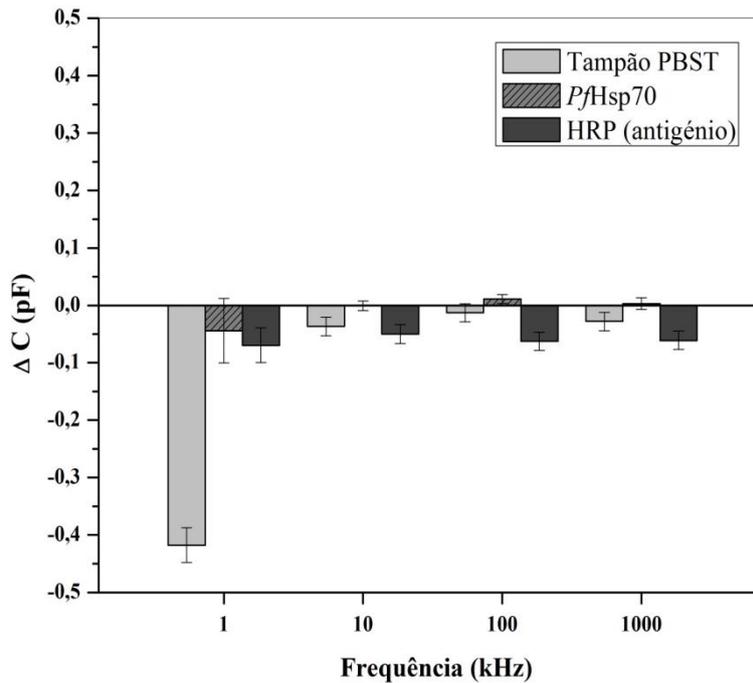


Figura 3.15 – Comparação da variação de capacidade do IDC<sub>PVDF</sub> V, para o teste sem antigénio (tampão PBST), teste com antigénio HRP (analito específico) e teste com *PfHsp70* (analito não específico). No fabrico do sensor foi utilizada cola epóxi para fixar a membrana sobre os microelétrodos. Anticorpo anti-HRP (200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) foi imobilizado nas membranas, com bloqueio posterior com leite em pó 5% (p/v). Sobre os respetivos sensores foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de solução de HRP (117  $\mu\text{g/mL}$ ) e *PfHsp70* (187  $\mu\text{g/mL}$ ).

A variação da capacidade provocada pelo tampão PBST foi negativa e superior ao erro associado, estando de acordo com os resultados observados na secção 3.1.2 relativamente ao efeito do tampão na capacidade do sistema. A variação da capacidade para o teste com o analito não específico *PfHsp70* pode ser considerada nula, pois para as quatro frequências analisadas, a variação obtida foi inferior ao erro. A adição deste analito na membrana não provocou, portanto, qualquer alteração significativa no sistema, pelo que poderá nem estar presente no interior da matriz. A variação produzida no teste com antigénio HRP foi superior ao erro associado, para todas as frequências, mas negativa e semelhante à variação da capacidade no teste sem antigénio, para as frequências superiores a 1 kHz. Com base nestes resultados, não se pode considerar que o sensor com cola epóxi tenha produzido uma resposta distinta do teste com tampão PBST em relação ao teste com HRP. A espessura da camada de cola foi determinada como tendo cerca de 50  $\mu\text{m}$  de espessura (ver Anexo IV), um valor não desejável pois compreende apenas um quarto da zona de deteção.

Os sensores com membrana de PVDF aqui apresentados necessitam ainda de investigação sobre o processo de fixação da membrana ao transdutor, o tipo de medição elétrica e o aumento da sensibilidade da camada sensível produzida pelos anticorpos imobilizados. O processo de fixação da membrana tem de garantir que a extremidade inferior da matriz esteja o mais próximo possível do transdutor, tendo também de assegurar que a espessura da interface entre a membrana e o transdutor

seja igual e constante durante as repetições do sensor. As baixas variações de capacidade na presença do antigénio podem também ser resultado de uma fraca sensibilidade do método de medição elétrica, sendo necessária uma análise futura sobre métodos de medição alternativa, como por exemplo, a utilização de medidas diferenciais com um amplificador *Lock-In*. Por fim, a quantidade de anticorpo aplicada nas membranas pode ser insuficiente para promover uma alteração significativa da capacidade do sensor. Uma solução seria saturar a membrana com anticorpo. No entanto, esta abordagem apresenta uma desvantagem imediata, pois iria encarecer o processo de fabrico do sensor. É então necessário um estudo sobre a quantidade de anticorpo mínima na membrana para gerar um sinal passível de medição e conseqüente viabilidade económica do sensor.

### 3.2 Sensor com nanobastonetes de ZnO

#### 3.2.1 Deposição e caracterização dos nanobastonetes de ZnO à superfície do transdutor

Como foi referido anteriormente, os nanobastonetes de ZnO apresentam propriedades interessantes – cinética de transferência eletrónica rápida; ponto isoelétrico elevado; razão área superficial/volume elevada; estabilidade química; atividade eletroquímica; biocompatibilidade – que os tornam bastante atrativos como suporte à imobilização de biomoléculas para fins sensoriais<sup>37-39</sup>. O processo de imobilização de proteínas sobre os nanobastonetes de ZnO é mais complexo do que no caso das membranas de PVDF, requerendo a utilização de agentes de reticulação (*cross-linkers*). No entanto, devido à ligação estabelecida entre as nanoestruturas e as proteínas ser mais robusta do que a mera fisissorção, é menos provável que ocorra perda de material biológico nas lavagens dos sensores, durante as fases de fabrico e teste.

Os nanobastonetes foram sintetizados diretamente sobre os microelétrodos de ouro com 10  $\mu\text{m}$  de espaçamento (G) e largura (W). Aplicando a fórmula  $\lambda_{\text{IDC}}=2(G+W)^{13}$  obtém-se que a região de medida é de 40  $\mu\text{m}$ , cobrindo perfeitamente a camada sensível (espessura de  $\mu\text{m}$ ) resultante da imobilização de anticorpos sobre os nanobastonetes. O método de síntese das nanoestruturas aplicado neste trabalho consistiu na síntese química hidrotérmica. O processo consiste na deposição de pequenos centros de nucleação (*seeds*) sobre a superfície do substrato onde irá ocorrer o crescimento das estruturas, seguido da colocação do substrato em contato com uma solução aquosa aquecida, voltado para baixo, desencadeando o crescimento das estruturas a partir das *seeds*. O método é relativamente simples e com baixo custo associado. Não necessita de temperaturas elevadas e produz um grande volume de estruturas de ZnO<sup>37</sup>.

O primeiro passo no desenvolvimento do sensor com nanobastonetes de ZnO ( $\text{IDC}_{\text{ZnO}}$ ) consistiu na seleção da melhor condição de síntese das nanoestruturas à superfície dos microelétrodos. Foram

analisados quatro tempos de síntese – 1,5, 3, 5 e 7 horas – num reator com agitação e temperatura controlados (ver secção 2.2.7.2). Os resultados dos quatro tempos de síntese encontram-se no Anexo V. As sínteses de 5 e 7 horas produziram uma camada de nanobastonetes que cobria perfeitamente a área abrangida pelos microelétrodos. Por uma questão prática do fabrico do sensor, estabeleceu-se o tempo de síntese em 6 horas.

Os nanobastonetes sintetizados sobre a superfície do transdutor foram caracterizados por microscopia eletrónica no Centro de Investigação de Materiais da FCT-UNL (ver Figura 3.16). As nanoestruturas compõem uma matriz heterogénea tridimensional à superfície do transdutor e apresentam uma configuração em estrela, sendo que as pontas possuem uma altura média de 500 nm e uma largura de cerca de 100 nm.

A estabilidade dos nanobastonetes em contato com a solução de tampão PBS foi testada, lavando o transdutor durante 30 minutos com tampão PBS, duas vezes com um passo intermédio de secagem. Na Figura 3.17 está representada uma secção do transdutor após a síntese dos nanobastonetes e a mesma secção após as duas lavagens com tampão PBS. As nanoestruturas de ZnO permaneceram intactas após as lavagens. A estabilidade dos nanobastonetes é importante para o bom funcionamento do sensor, uma vez que as estruturas representam o suporte de imobilização dos anticorpos, pelo que é importante que permaneçam inalteradas durante o processo de fabrico do sensor, bem como durante o teste das soluções sem e com analitos.

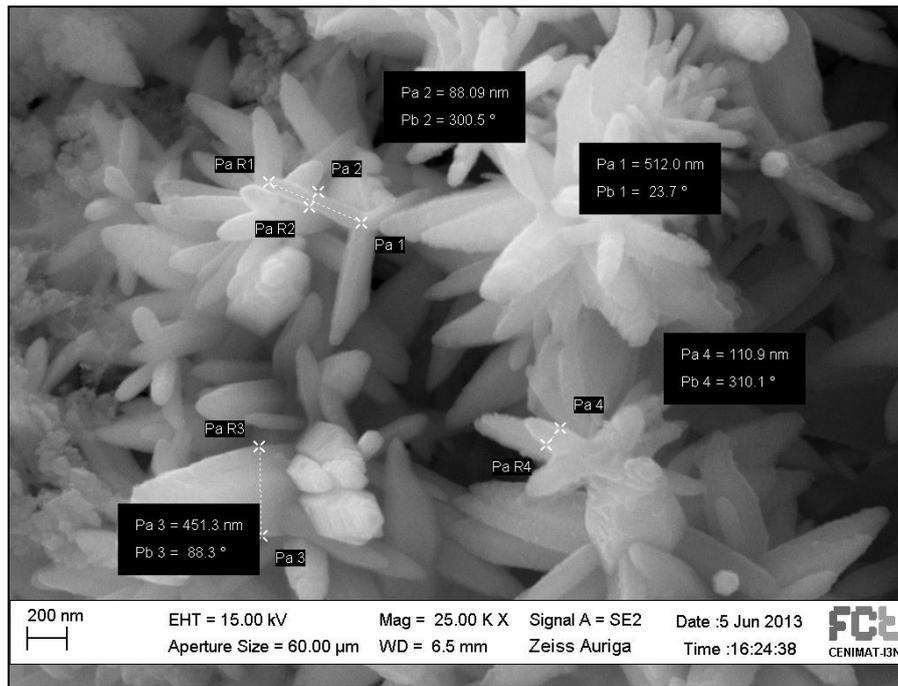


Figura 3.16 – Caracterização dos nanobastonetes de ZnO sintetizados à superfície do transdutor. Imagem SEM realizada no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (CENIMAT, FCT-UNL).

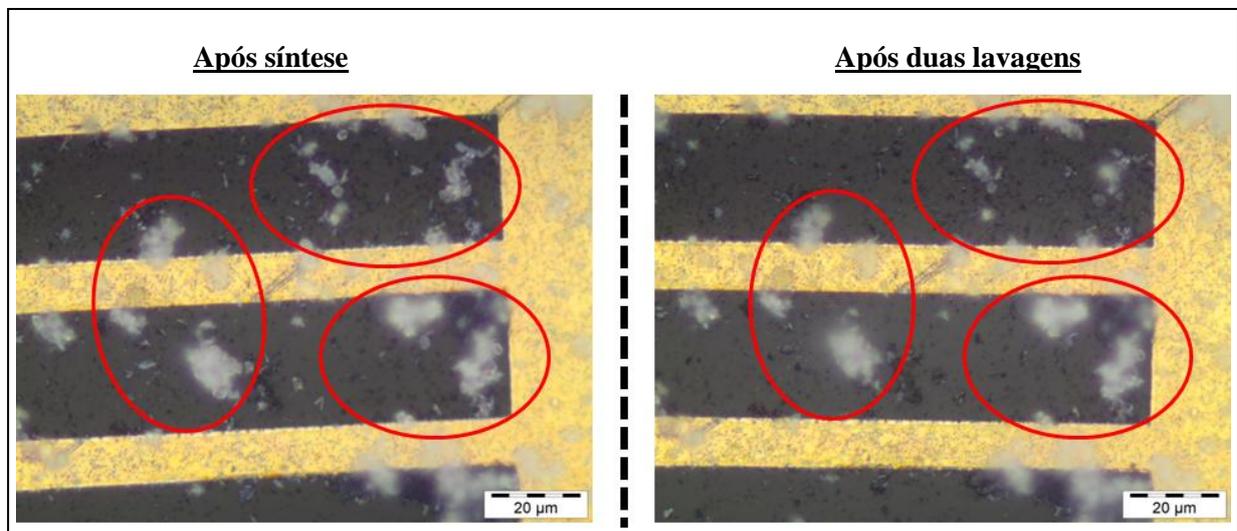


Figura 3.17 – Avaliação da estabilidade dos nanobastonetes de ZnO após contato com a solução de tampão PBS. O transdutor com nanobastonetes foi lavado duas vezes com tampão PBS. As nanoestruturas permaneceram intactas após o contato com o tampão, como se pode observar nas regiões circuladas a vermelho.

### 3.2.2 Detecção do antígeno HRP

Uma vez confirmada a estabilidade dos nanobastonetes de ZnO, prosseguiu-se à construção de três sensores idênticos, sintetizando simultaneamente as nanoestruturas sobre três transdutores, no interior

de um reator (ver secção 2.2.7.2). Seguidamente os três sensores foram sujeitos a um passo de reticulação do anticorpo aos nanobastonetes, seguido de um passo de bloqueio. Cada um dos sensores preparados foi então testado com uma solução diferente. Na Figura 3.18 estão representadas a componente real ( $Z_{Re}$ ) e imaginária ( $Z_{Im}$ ) da impedância ao longo da construção e teste dos três sensores.

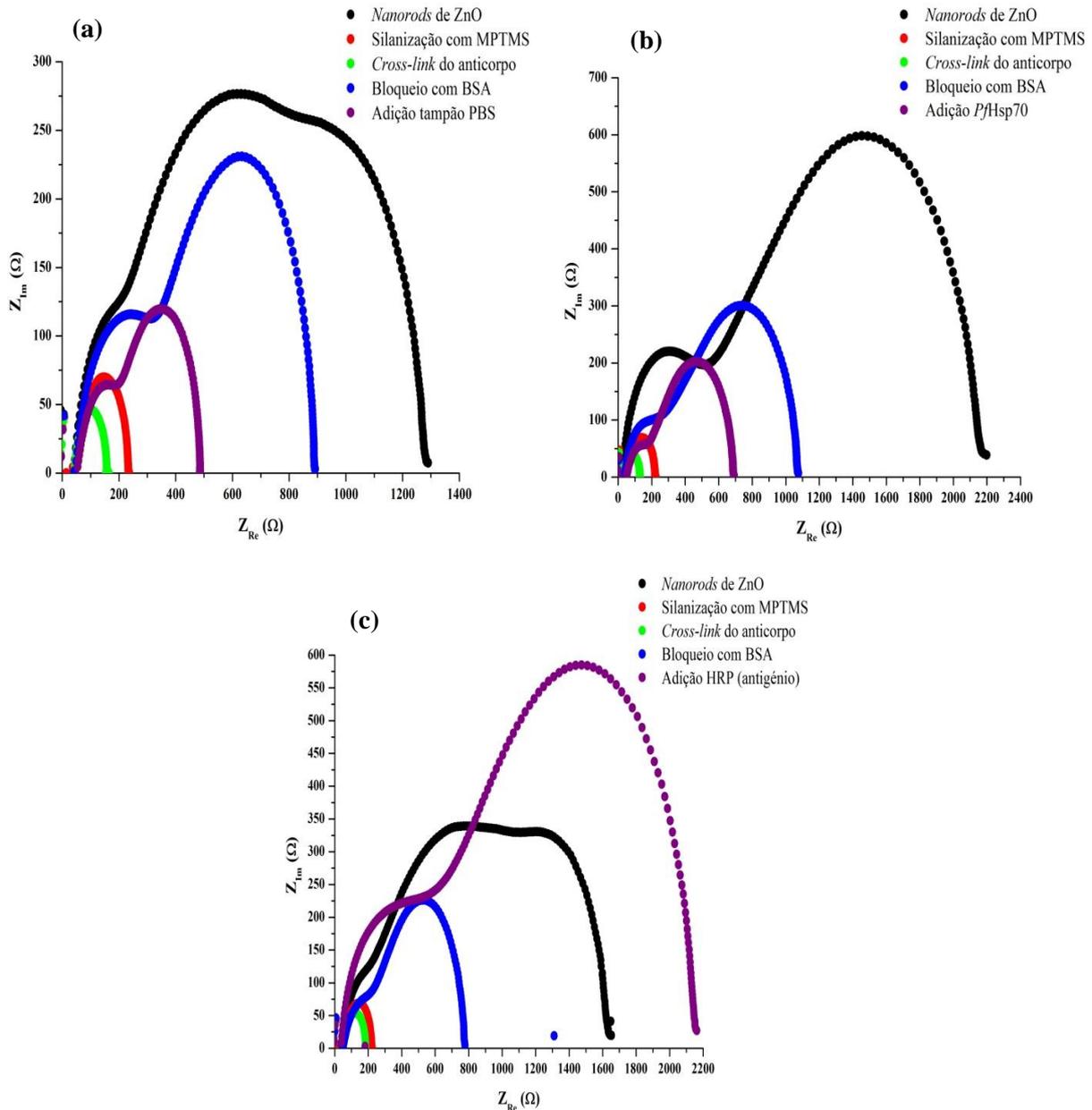


Figura 3.18 – Comparação da componente real ( $Z_{Re}$ ) e imaginária ( $Z_{Im}$ ) da impedância para cada passo da construção e teste dos três sensores: a) sensor testado com tampão PBS; b) sensor testado com solução de *PfHsp70* (analito não específico); c) sensor testado com antigénio HRP (analito específico).

Pela análise das duas componentes da impedância observa-se que cada passo da construção do IDC<sub>ZnO</sub> produziu uma alteração da impedância comum aos três sensores. O revestimento dos nanobastonetes com MPTMS (Figura 3.18, curva vermelha) e reticulação (*cross-linking*) do anticorpo (Figura 3.18, curva verde) provocaram uma descida sucessiva e acentuada tanto  $Z_{Re}$ , como da  $Z_{Im}$ , nos três sensores. A adição destas moléculas à superfície dos transdutores pode estar a facilitar a condução de corrente através das pistas dos microelétrodos, resultando numa diminuição da impedância do sistema. O bloqueio com BSA teve um efeito contrário, provocando um aumento da componente imaginária (entre 150 e 250  $\Omega$ ) e real (entre 600 e 950  $\Omega$ ) da impedância. Comparando variação da  $Z_{Re}$  e  $Z_{Im}$  após o bloqueio, observa-se que para os três sensores a componente real – relacionada com a resistência do sistema – é a que apresenta maior variação. O agente de bloqueio foi aplicado em excesso (5% p/v), de forma a garantir que todos os locais livres à superfície do transdutor fossem ocupados. O excesso de BSA aplicado pode ter formado zonas de grande acumulação da proteína, criando uma barreira resistiva sobre o transdutor. A semelhança no comportamento da variação da impedância (real e imaginária) para os três sensores, em cada passo do processo de fabrico é um fator indicativo da sua reprodutibilidade.

Na fase de teste do sensor, observa-se que a aplicação da solução de tampão PBS e da solução de PfHsp70 (analito não específico) provocou uma variação da impedância idêntica. Para as duas soluções, a  $Z_{Im}$  variou -100  $\Omega$  e a  $Z_{Re}$  variou -400  $\Omega$ . A aplicação da solução de antigénio HRP (analito específico) provocou uma variação de 375  $\Omega$  para a  $Z_{Im}$  e de 1400  $\Omega$  para a  $Z_{Re}$ . A ligação do antigénio ao anticorpo aumentou a impedância do sistema, com uma maior contribuição da componente resistiva.

Na Figura 3.19.a está expressa a variação da capacidade do sensor IDC<sub>ZnO</sub> no intervalo de frequência entre 100 Hz e 10 MHz para cada um dos testes efetuados.

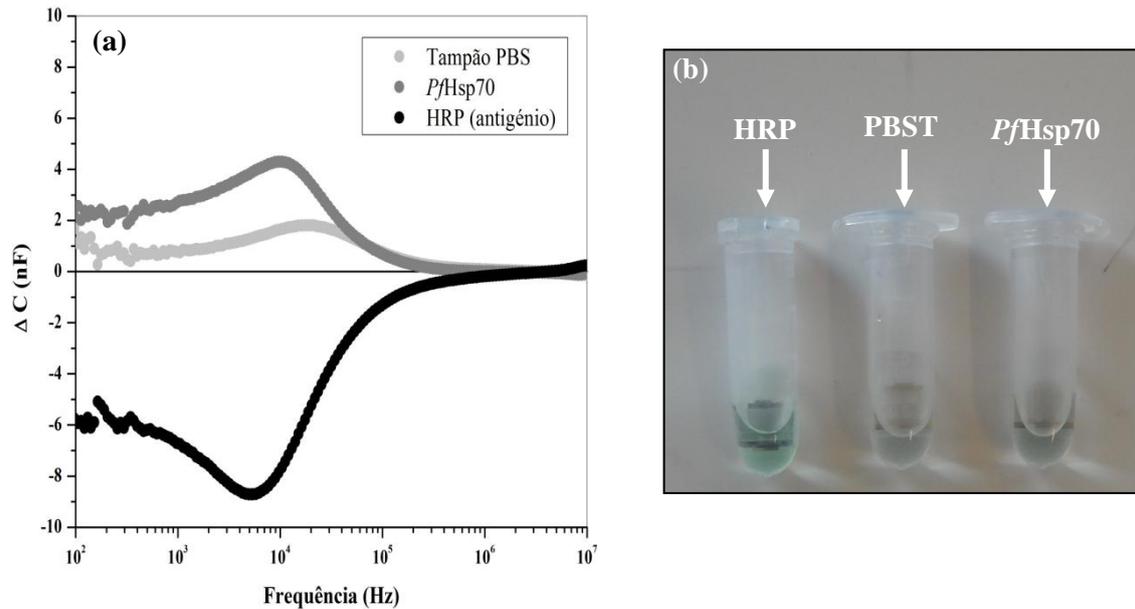


Figura 3.19 – (a) Comparação da variação da capacidade do sensor  $IDC_{ZnO}$  para as soluções de tampão PBS,  $PfHsp70$  (analito não específico) e antígeno HRP (analito específico). (b) Confirmação da presença do antígeno HRP no sensor através da oxidação do substrato ABTS. Apenas a solução em contato com o sensor com HRP sofreu alteração de cor, confirmando a presença do antígeno.

A aplicação de solução com antígeno HRP sobre o sensor produziu uma variação negativa da capacidade, mais acentuada no intervalo de frequências entre 1 e 10 kHz ( $-6,75 \pm 3\%$  nF e  $-7,65 \pm 4\%$  nF, respetivamente). Para as mesmas frequências, a aplicação da solução de tampão PBS ( $0,76 \pm 62\%$  nF e  $1,67 \pm 25\%$  nF) e de  $PfHsp70$  ( $2,77 \pm 9\%$  nF e  $4,29 \pm 6\%$  nF) produziu uma variação positiva da capacidade. Estes sensores geraram, portanto, um sinal capaz de discriminar entre a presença e ausência do antígeno especificamente detetado pelo anticorpo imobilizado. O intervalo de frequências onde houve maior variação da capacidade (1-10 kHz) encontra-se na gama ótima de frequências (20 Hz a 6 kHz) para detetar alterações de capacidade como consequência do evento de ligação entre anticorpo e antígeno<sup>45</sup>.

A confirmação da presença do antígeno HRP no sensor foi feita através da incubação do sensor durante 3 minutos com solução de ABTS. Os restantes sensores, que não contêm a enzima, foram incubados nas mesmas condições, servindo de controlo negativo. Na Figura 3.19.b observa-se que apenas a solução em contato com o sensor de HRP sofreu uma mudança de cor, resultado da oxidação do ABTS catalisada pela enzima, provando que o antígeno encontra-se presente no sensor. Nos restantes dois sensores, a cor da solução de ABTS permaneceu inalterada, pois não há enzima disponível para promover a oxidação do substrato ABTS.

O sensor  $IDC_{ZnO}$  analisado conseguiu gerar um sinal distinto indicativo da presença do antígeno, constituindo um ponto de partida promissor no desenvolvimento de um dispositivo capaz de

imunodeteção. Serão necessárias repetições adicionais do sensor, de forma a avaliar a sua reprodutibilidade, bem como um estudo de estabilidade, sensibilidade e intervalo de concentrações de forma a determinar uma gama de trabalho onde a resposta do sensor seja proporcional à presença do antigénio. Por último, a resposta do sensor terá de ser avaliada na presença de amostras biológicas complexas e comparada com outros métodos de imunodeteção.

**CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS  
FUTURAS**



#### 4 Conclusões e Perspetivas Futuras

No trabalho foi estudado o desenvolvimento de biossensores capacitivos compostos por microelétrodos interdigitais e anticorpos imobilizados, enquanto um sistema capaz de imunodeteção. A aplicação de matrizes de suporte à imobilização de anticorpos sobre o transdutor foi analisada para dois tipos de materiais – membranas comerciais de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) e nanobastonetes de Óxido de Zinco (ZnO). A conjugação das matrizes com um transdutor composto por microelétrodos é uma abordagem inovadora que poderá permitir a sua utilização em sistemas de imunodeteção em vez de nanoelétrodos, que representam uma alternativa de fabricação mais dispendiosa.

As membranas comerciais de PVDF permitiram que o processo de imobilização das biomoléculas fosse efetuado de uma forma simples e económica, sem necessidade de recorrer a agentes de reticulação (*cross-linkers*), bastando apenas depositar uma solução de anticorpo sobre a membrana, ocorrendo um processo de fisossorção do anticorpo à membrana.

O ensaio com o substrato cromogénico ABTS referente ao efeito do tratamento prévio da membrana comercial de PVDF com álcool demonstrou que a hidratação da membrana resulta numa retenção de antigénio cerca de 4 vezes maior do que quando a membrana se encontra desidratada. O tratamento prévio da membrana com álcool resulta então numa maior penetração do antigénio na matriz, arrastado pela respetiva solução que o contém. Os ensaios da difusão do anticorpo e antigénio através da membrana demonstraram que as biomoléculas são capazes de atravessar a matriz microporosa da membrana de PVDF em toda a sua extensão, pelo que o evento de biorreconhecimento poderá ocorrer assim ao longo da região de medição do campo elétrico.

As variações de capacidade registadas pelos sensores testados com membranas de PVDF com soluções sem e com antigénio foram baixas (inferiores a 1 pF) e próximas ou inferiores ao erro de medição associado ao aparelho. As baixas variações de capacidade obtidas podem também ser resultado de uma fraca sensibilidade do método de medição elétrica, sendo necessária uma análise futura sobre métodos de medição alternativa, como por exemplo, a utilização de medidas diferenciais com um amplificador *Lock-In*. No entanto, é de notar que nos sensores com anticorpo anti-*Pf*Hsp70 ( $IDC_{PVDF}$  I) e antigénio Hsp70 ( $IDC_{PVDF}$  II) imobilizados nas membranas, as variações de capacidade para as soluções sem e com analito foram distintas, no intervalo de frequências entre 1 e 10 kHz. O sensor com anticorpo anti-HRP imobilizado, onde foi depositado o antigénio HRP enquanto a membrana estava humedecida ( $IDC_{PVDF}$  III), também registou uma variação oposta da capacidade para as duas soluções, no intervalo de frequências entre 1 kHz e 1 MHz, sendo que a maior variação ocorreu a 1 kHz. Estes resultados indicam que a deteção de interações entre anticorpos e antigénios por EI poderá ser feita a frequências inferiores a 10 kHz.

O efeito do tampão PBST na variação da capacidade foi analisado e verificou-se que este provoca uma descida sistemática e gradual da capacidade em cada medição. A variação negativa provocada pelo tampão poderá mascarar o sinal produzido pelo evento de biorreconhecimento. Será necessário efetuar estudos adicionais que esclareçam este efeito observado para o tampão. Em alternativa, o sistema de medição poderá ser alterado para um modelo diferencial, onde num sensor é apenas medida a variação da capacidade com aplicação de tampão, enquanto num sensor teste é medida a variação da capacidade com aplicação da amostra. O sinal do sensor com tampão será subtraído ao sinal do sensor com a amostra, sendo o sinal final equivalente apenas à presença/ausência do antigénio na amostra.

Relativamente ao processo de fixação da membrana sobre o transdutor, é necessário um estudo aprofundado. O processo de fixação da membrana tem de garantir que a extremidade inferior da matriz esteja o mais próximo possível do transdutor e que a espessura da interface entre a membrana e o transdutor seja igual e constante durante as repetições do sensor. A produção de um filme fino homogéneo de cola por deposição de filme fino (*spin-coating*) antes da fixação da membrana foi testada no sensor IDC<sub>PVDF</sub> V. A cola de Cianocrilato usada na fixação das membranas dos sensores I a IV não é compatível com *spin-coating*, pelo que se utilizou uma cola epóxi. A resina foi bem-sucedida na criação de um filme fino homogéneo capaz de fixar a membrana sobre o transdutor. Porém, a variação de capacidade no teste do sensor não apresentou melhorias em relação aos sensores anteriores, porque a espessura do filme produzido foi elevada – aproximadamente 50 µm. Assim, terão de ser avaliados métodos alternativos reproduzíveis para a fixação da membrana, que assegurem o contato mais próximo e constante entre a membrana e o transdutor. Uma solução possível passa pela utilização de uma cola menos viscosa ou em aumentar o número de rotações durante o processo do filme fino.

No sensor cuja matriz de suporte à imobilização de anticorpos era composta por nanobastonetes de Óxido de Zinco (IDC<sub>ZnO</sub>) observou-se uma diferença distinta entre o sinal produzido no teste com antigénio HRP (variação negativa da capacidade) e os sinais produzidos na ausência do antigénio e resposta na presença de um analito não específico (variação positiva da capacidade para ambos os casos). A confirmação da presença do antigénio HRP com o substrato cromogéneo ABTS reforçou a ideia de que o antigénio se encontrava ligado ao anticorpo imobilizado sobre as nanoestruturas do sensor, confirmando a variação negativa da capacidade como resultado da ligação do analito ao biorreceptor.

A variação da capacidade no teste com antigénio foi maior nas frequências 1 e 10 kHz. Tal como nos sensores IDC<sub>PVDF</sub>, a deteção de interações entre anticorpos e antigénios por EI poderá ser feita a frequências inferiores a 10 kHz.

O sensor IDC<sub>ZnO</sub> desenvolvido neste trabalho terá de ser avaliado do ponto de vista de reprodutibilidade, mas os resultados preliminares obtidos foram bastante promissores. Uma vez

confirmada esta reprodutibilidade, serão necessários estudos adicionais a diferentes concentrações de antigénio, para determinar a sensibilidade e intervalo de funcionamento do sensor, onde a resposta gerada é proporcional à presença do antigénio na amostra. A resposta do sensor terá de ser testada com amostras biológicas complexas, onde o antigénio estará misturado com outros analitos (não específicos) em solução. Finalmente, poderão ser testados diferentes pares de anticorpo/antigénio na construção do sensor, de forma a comparar a uniformidade do sinal produzido. Se sensor for capaz de produzir um sinal constante, independentemente do par anticorpo/antigénio utilizado, então ter-se-á estabelecido um novo sistema para imunodeteção baseado em microtransdutores capacitivos interdigitais.

Em suma, neste trabalho foi demonstrado com sucesso a aplicação de matrizes de suporte à imobilização de anticorpos detetores sobre microelétrodos, com vista a maximizar a sua distribuição ao longo da região de interação do campo elétrico. Foi demonstrado que os anticorpos encontram-se presentes nas membranas de PVDF aplicadas e que tanto os anticorpos, como os respetivos antigénios são capazes de penetrar na membrana, encontrando-se perfeitamente distribuídos ao longo da região de interação. Os sensores com nanobastonetes de ZnO produziram resultados bastante promissores, constituindo um bom ponto de partida para a construção de um novo sistema para imunodeteção, capaz de competir com a configuração tradicional dos transdutores capacitivos com nanoelétrodos interdigitais.



## **CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 5 Referências Bibliográficas

1. Newman, J. D. & Setford, S. J. Enzymatic Biosensors. *Molecular Biotechnology* **32**, 249–268 (2006).
2. Yoo, E.-H. & Lee, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* **10**, 4558–4576 (2010).
3. Fracchiolla, N. S., Artuso, S. & Cortelezzi, A. Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology. *Sensors* **13**, 6423–6447 (2013).
4. Holford, T. R. J., Davis, F. & Higson, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **34**, 12–24 (2012).
5. Tothill, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 55–62 (2009).
6. Monošík, R., Stred'anský, M. & Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca* **5**, 109–120 (2012).
7. Vo-Dinh, T. & Cullum, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **366**, 540–551 (2000).
8. Susanto, H., Samsudin, a M., Rokhati, N. & Widiassa, I. N. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. *Enzyme and Microbial Technology* **52**, 386–392 (2013).
9. Moyo, M., Okonkwo, J. O. & Agyei, N. M. Recent Advances in Polymeric Materials Used as Electron Mediators and Immobilizing Matrices in Developing Enzyme Electrodes. *Sensors* **12**, 923–953 (2012).
10. Sakai-Kato, K. & Ishikura, K. Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology. *Analytical Sciences* **25**, 969–978 (2009).
11. Berggren, C., Bjarnason, B. & Johansson, G. Capacitive Biosensors. *Electroanalysis* **13**, 173–180 (2001).
12. Pänke, O., Balkehnohl, T., Kafka, J., Schäfer, D. & Lisdat, F. Impedance Spectroscopy and Biosensing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **109**, 195–237 (2008).
13. Igreja, R. & Dias, C. J. Extension to the analytical model of the interdigital electrodes capacitance for a multi-layered structure. *Sensors and Actuators A: Physical* **172**, 392–399 (2011).
14. Fowler, R. J. & Lana, J. M. G. in *Eletricidade: Princípios e Aplicações* (Filho, M. & Bertolla, A.) 72–132 (Makron Books, 1992).
15. Zou, Z., Kai, J., Rust, M. J., Han, J. & Ahn, C. H. Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement. *Sensors and Actuators A: Physical* **136**, 518–526 (2007).
16. Venkatanarayanan, A., Keyes, T. E. & Forster, R. J. Label-Free Impedance Detection of Cancer Cells. *Analytical Chemistry* **85**, 2216–2222 (2013).

17. Lisdat, F. & Schäfer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 1555–1567 (2008).
18. Alberts, B. *et al.* in *Molecular Biology of The Cell* (Anderson, M. & Granum, S.) 1539–1601 (Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008).
19. Hau, J. & Hendriksen, C. F. M. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. *ILAR Journal* **46**, 294–299 (2005).
20. Mahboudi, F. *et al.* The Role of Different Supplements in Expression Level of Monoclonal Antibody against Human CD20. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* **5**, 140–147 (2013).
21. Flego, M., Ascione, A., Cianfriglia, M. & Vella, S. Clinical development of monoclonal antibody-based drugs in HIV and HCV diseases. *BMC Medicine* **11**, 4 (2013).
22. WHO. *World Malaria Report 2012*. (2012). at [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/report/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html)
23. Bousema, T. & Drakeley, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews* **24**, 377–410 (2011).
24. Alberts, B. *et al.* in *Molecular Biology of The Cell* (Anderson, M. & Granum, S.) 1485–1538 (Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008).
25. WHO. Health topics Malaria. (2013). at <http://www.who.int/topics/malaria/en/>
26. Bell, D. & Peeling, R. W. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nature Reviews Microbiology* **4**, S34–S38 (2006).
27. Moody, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 66–78 (2002).
28. Paek, S.-H., Cho, J.-H., Cho, I.-H., Kim, Y.-K. & Oh, B.-K. Immunosensors for Point-of-Care Testing. *Biochip Journal* **1**, 1–16 (2007).
29. Shonhai, A., Boshoff, A. & Blatch, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from Plasmodium falciparum. *Protein Science* **16**, 1803–1818 (2007).
30. Matambo, T. S., Odunuga, O. O., Boshoff, A. & Blatch, G. L. Overproduction, purification, and characterization of the Plasmodium falciparum heat shock protein 70. *Protein Expression and Purification* **33**, 214–222 (2004).
31. Van Gerwen, P. *et al.* Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **49**, 73–80 (1998).
32. Ma, C.-C., Huang, Y.-H. & Pan, S.-Y. Investigation of the Transient Behavior of a Cantilever Beam Using PVDF Sensors. *Sensors* **12**, 2088–2117 (2012).
33. Milipore. *Protein Blotting Handbook*. 1–56 (Milipore Corporation, 2005).

34. Reddy, S. B., Mainwaring, D. E., Kobaisi, M. Al, Zeepongsekul, P. & Fecondo, J. V. Acoustic wave immunosensing of a meningococcal antigen using gold nanoparticle-enhanced mass sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics* **31**, 382–387 (2012).
35. USNNI. What's So Special about the Nanoscale. at <http://www.nano.gov/nanotech-101/special>
36. Wang, Z. L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter* **16**, R829–R858 (2004).
37. Gomez, J. L. & Tigli, O. Zinc oxide nanostructures: from growth to application. *Journal of Materials Science* **48**, 612–624 (2013).
38. Anish Kumar, M., Jung, S. & Ji, T. Protein Biosensors Based on Polymer Nanowires, Carbon Nanotubes and Zinc Oxide Nanorods. *Sensors* **11**, 5087–5111 (2011).
39. Zhang, J., Wang, C., Chen, S., Yuan, D. & Zhong, X. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase-lectin biospecific interaction. *Enzyme and Microbial Technology* **52**, 134–140 (2013).
40. Corso, C. D., Dickherber, A. & Hunt, W. D. An investigation of antibody immobilization methods employing organosilanes on planar ZnO surfaces for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 805–811 (2008).
41. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004).
42. Katz, E. & Willner, I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis* **15**, 913–947 (2003).
43. Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of Peroxidase (EC 1.11.1.7) 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) as a Substrate. 1–3 at <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-peroxidase-abts-as-substrate.html>
44. Solís-Pomar, F., Martínez, E., Meléndrez, M. F. & Pérez-Tijerina, E. Growth of vertically aligned ZnO nanorods using textured ZnO films. *Nanoscale Research Letters* **6**, 524 (2011).
45. Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Stöcklein, W. & Schmid, R. D. Real-Time Monitoring of Immunochemical Interactions with a Tantalum Capacitance Flow-Through Cell. *Analytical Chemistry* **64**, 997–1003 (1992).
46. Kittelberger, R. & Reichel, M. P. Evaluation of electrophoretic immunoblotting for *Brucella ovis* infection in deer using ram and deer serum. *New Zealand Veterinary Journal* **46**, 32–34 (1998).
47. Clark, R. K., Tani, Y. & Damjanov, I. Suppression of nonspecific binding of avidin-biotin complex (ABC) to proteins electroblotted to nitrocellulose paper. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **34**, 1509–1512 (1986).



## **CAPÍTULO 6 – ANEXOS**



## 6 Anexos

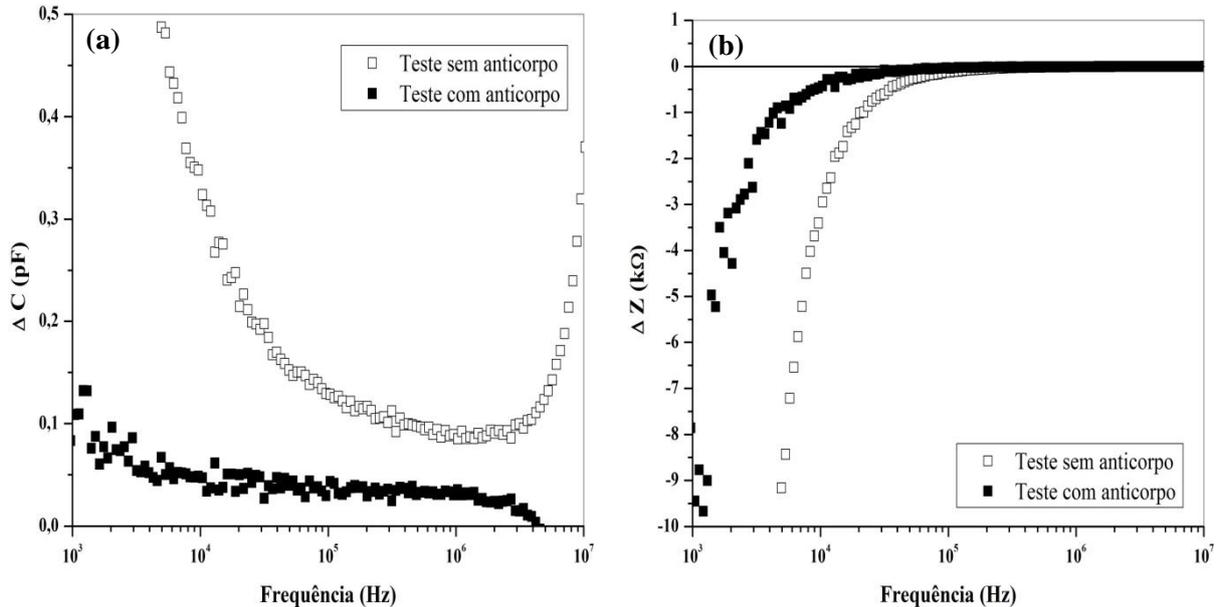
6.1 Anexo I – Variação da capacidade e impedância para o sensor IDC<sub>PVDF</sub> II

Figura 6.1 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antigénio *PfHsp70* (33 µg/mL) immobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti-*PfHsp70* em tampão PBST (141 µg/mL).

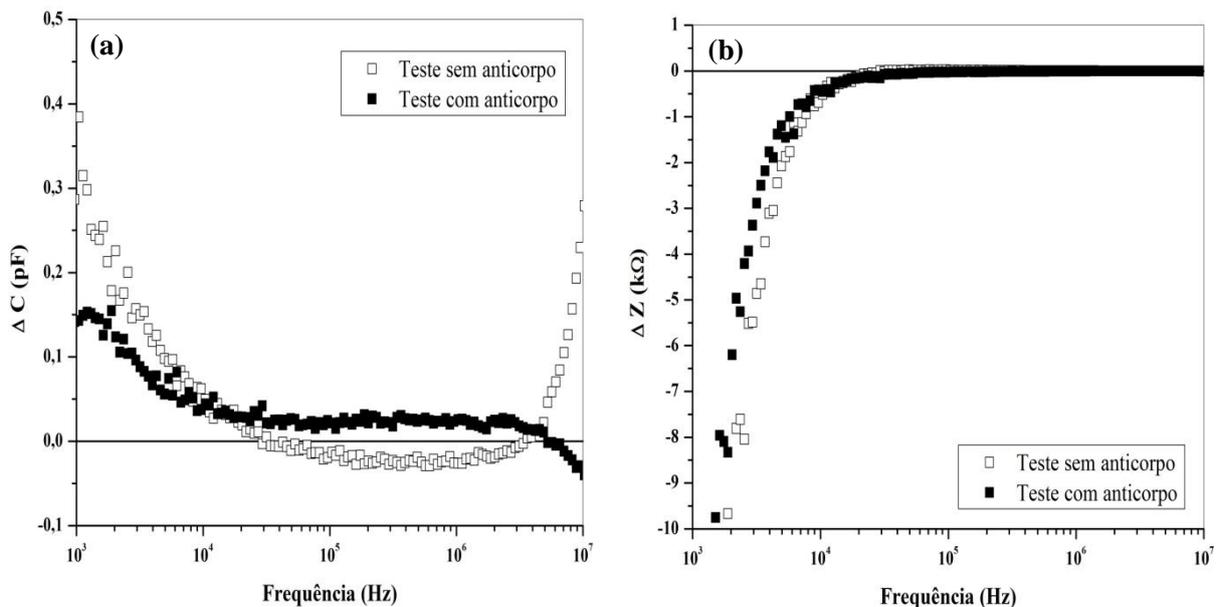


Figura 6.2– Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antigénio *PfHsp70* (66 µg/mL) immobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti-*PfHsp70* em tampão PBST (283 µg/mL).

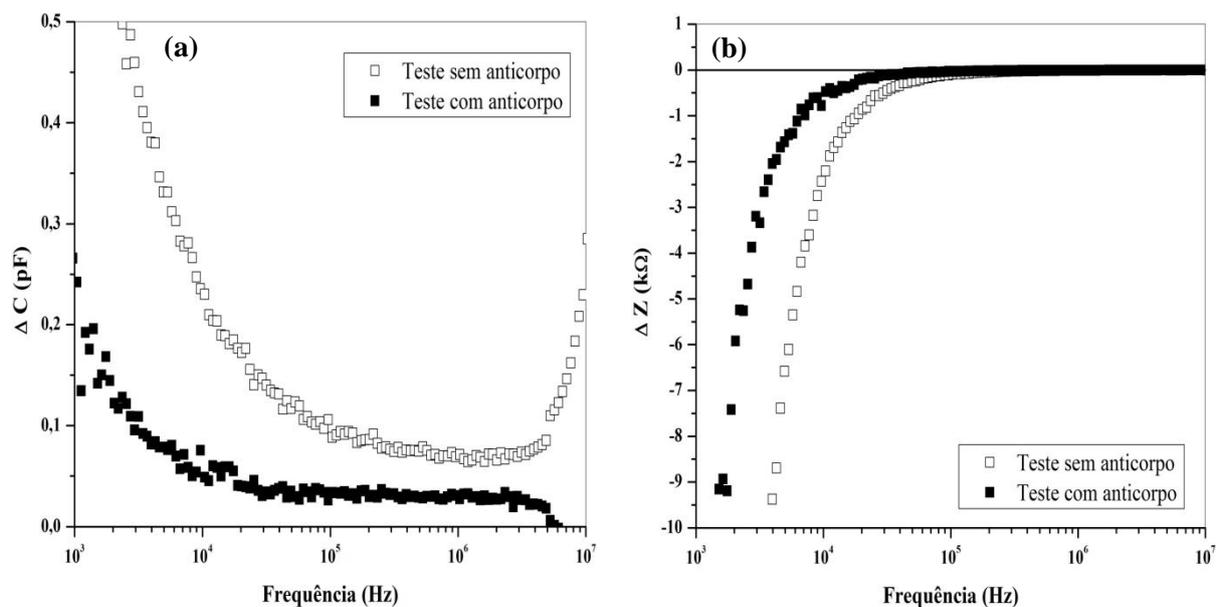


Figura 6.3 – Variação da capacidade (a) e impedância (b) em função da frequência no sensor com antígeno *P/Hsp70* (100  $\mu\text{g/mL}$ ) imobilizado na membrana de PVDF, em duas condições: teste sem anticorpo – aplicação de tampão PBST; teste com anticorpo – aplicação de anti-*P/Hsp70* em tampão PBST (429  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 6.2 Anexo II – Composição elementar da membrana de PVDF tratada com tampão PBST

Tabela 2 – Composição elementar de uma seção de membrana de PVDF tratada com tampão PBST. A porcentagem de cada elemento foi determinada por Espectroscopia de Energia Dispersiva.

Elemento	Porcentagem presente na membrana (%)
C	32,94
O	6,9
F	45,80
Na	3,16
P	0,73
Cl	3,87
K	0,76
Ca	0,15
Cr	5,70
<b>Total</b>	<b>100</b>

### 6.3 Anexo III – Confirmação da presença do antígeno HRP na membrana do sensor IDC<sub>PVDF</sub> IV

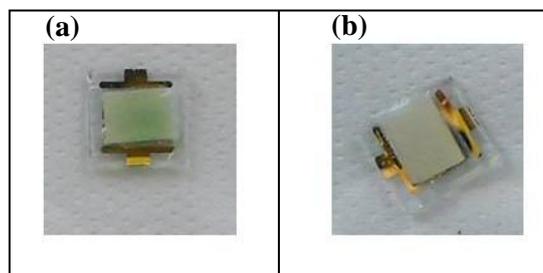


Figura 6.4 – Confirmação da presença do antígeno HRP na membrana do sensor IDC<sub>PVDF</sub> IV: (a) sensor com HRP presente na membrana, confirmado pela alteração de cor da solução de ABTS; (b) controlo negativo onde não se observa alteração de cor da solução de ABTS (sensor com *PfHsp70*).

### 6.4 Anexo IV – Determinação da espessura do filme fino de cola epóxi

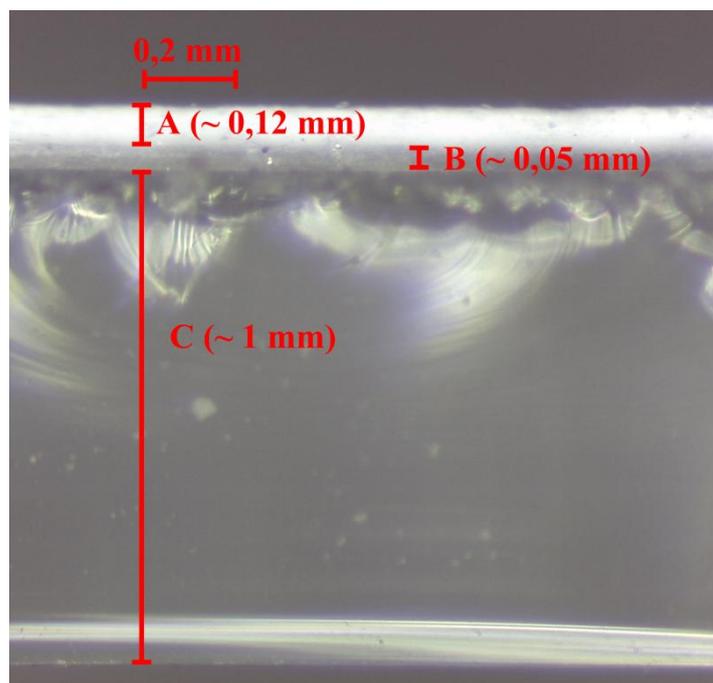


Figura 6.5 – Determinação da espessura do filme fino de cola epóxi entre o substrato de vidro e a membrana de PVDF. A – membrana de PVDF (120  $\mu\text{m}$ ); B – filme fino de cola epóxi (50  $\mu\text{m}$ ); C – substrato de vidro (1 mm).

### 6.5 Anexo V – Síntese de nanobastonetes de ZnO sobre o transdutor realizada a quatro intervalos de tempo diferentes

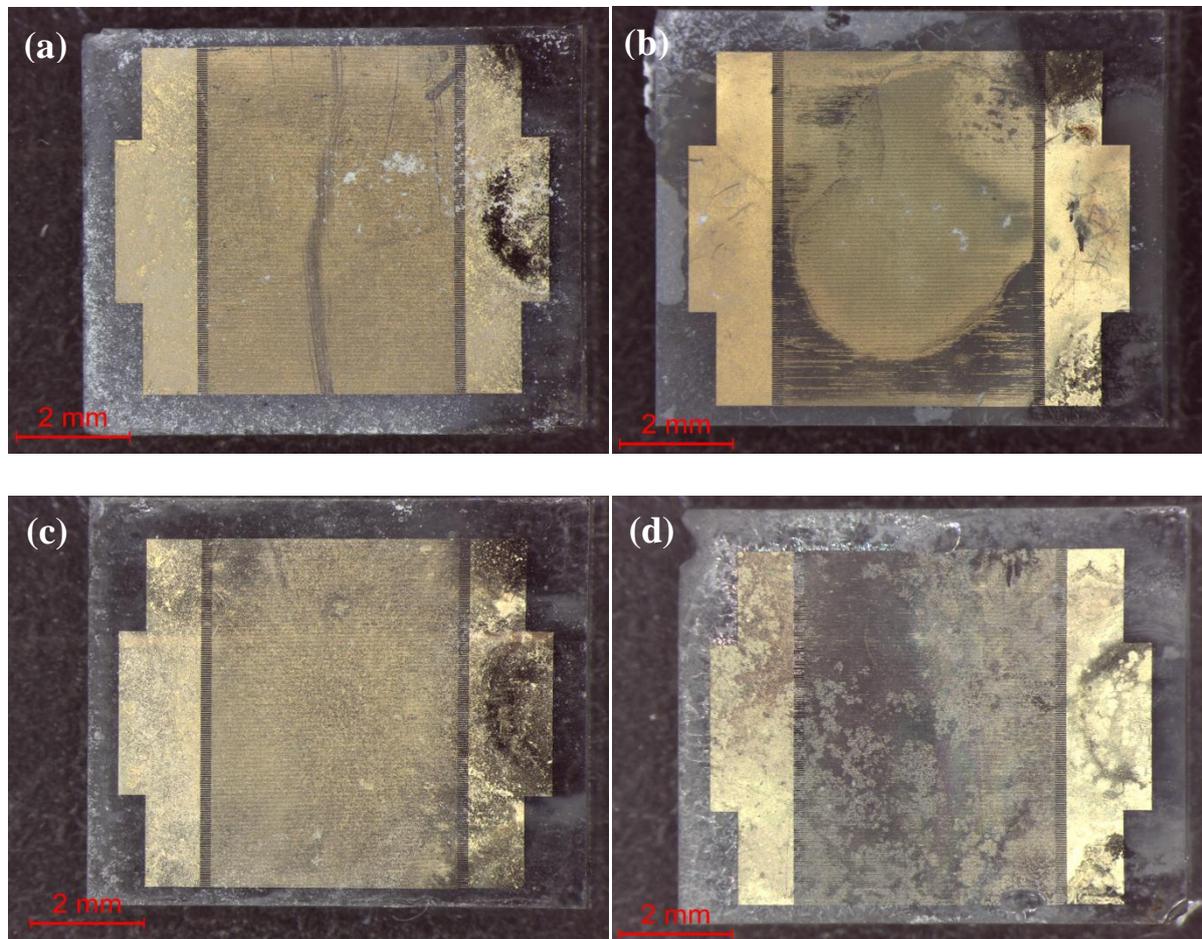


Figura 6.6 – Síntese de nanobastonetes de ZnO sobre o transdutor realizada em quatro intervalos de tempo diferentes: (a) 1,5 horas; (b) 3 horas; (c) 5 horas; (d) 7 horas.