

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Desenvolvimento de imunoenaios eletroquímicos para  
determinação de biomarcadores aplicados no diagnóstico de  
doenças em cultivares”**

**Tayane Aguiar Freitas\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador:** Ronaldo Censi Faria

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP**  
**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tayane Aguiar Freitas, realizada em 06/03/2020.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz (UFSCar)

Profa. Dra. Ivana Cesarino (UNESP)

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

# **DEDICATÓRIA**

**Aos meus amados pais Iranilde e João, e à minha irmã Dayane, que acima de tudo são minha fortaleza e razão da minha existência.**

**Ao meu namorado Manoel, que tanto admiro, respeito e tenho orgulho de tê-lo ao meu lado.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por cada segundo da minha vida, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais Iranilde Aguiar e João Freitas, e a minha querida irmã Dayane Freitas, que são a minha base e que sempre estarei dando meu melhor para vê-los e fazê-los felizes.

Ao meu namorado Manoel Lima, que tanto me estimulou e apoiou para realizar o doutorado. Obrigada por todo suporte emocional, familiar e profissional, sem dúvida, você foi essencial nesta trajetória.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, e que durante a realização do doutorado me deu toda orientação, conhecimento, apoio e confiança. Toda experiência adquirida ao longo desses anos foi um grande ensinamento para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur pela parceria firmada, contribuindo grandemente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), em especial aos pesquisadores Rodrigo Facchini Magnani e Nelson Arno Wulff pela parceria e por conceder as amostras de plantas cítricas.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz, Profa. Dra. Ivana Cesarino, Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa por terem aceitado participar da minha banca de defesa de doutorado e terem disponibilizado seu tempo para aprimorar este trabalho.

À Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban e ao pesquisador Dr. Thiago Martimiano do Prado pelas excelentes contribuições sugeridas durante o seminário de defesa.

Aos companheiros(as) do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica: Karla, Tássia, Wilson, Grazielle, Taíse, Sthéfane, Sean,

Alexandrino, Thiago Guerreiro, Camila Rizzardi, Camila Erbereli, Vagner e Wyllian. Ao grupo GQA: Benedito, Frederico, Jorge, Cecília e Wallace, e ao grupo LABBES: Anderson, Elson e Tiago Almeida. Agradeço a todos pelas contribuições científicas, amizade e ótima convivência ao longo desses anos.

À Camila Proença e à Thaísa Baldo que conheci nesta trajetória e que me ajudaram de todas as formas, sendo duas parceiras de trabalho, amigas, irmãs e companheiras maravilhosas que tive muita sorte de tê-las ao meu lado.

À Mariana Pegrucci, Elsa Marteron, Ademar Yong e Flávio Makoto pela amizade, cumplicidade e parceria tanto acadêmica quanto pessoal.

A todos meus amigos maranhenses, em especial à Mayara Mondego, Ilma Mondego, Clayane Carvalho, Domingos Sérgio e Lucas Bosco, no qual tive o prazer de ser amiga durante a graduação (com a maioria), e agora no doutorado estreitamos ainda mais esse vínculo, sendo a família que construí em São Carlos e que me deram suporte em todos os momentos.

Aos amigos Marília Evelyn, Taís Franco, Rafaela Barreto, Theophilo Franco e Bryan de Barros do Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica pelo apoio dado neste final de doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial às secretárias da PPGQ: Ariane, Cristina e Luciani sempre muito prestativas e atenciosas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001) pelo financiamento desta pesquisa a partir da bolsa e auxílios concedidos ao longo do doutorado.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para construção deste trabalho, meu muito obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampère
Ab	Anticorpo
Ab <sub>1</sub>	Anticorpo monoclonal
Ab <sub>2</sub>	Anticorpo policlonal
Ab <sub>2</sub> /NPM	Nanopartículas magnéticas bioconjugadas com anticorpos policlonais
Ab <sub>2</sub> /NPM/HRP	Nanopartículas magnéticas bioconjugadas com anticorpos policlonais e enzima peroxidase
Ab <sub>2</sub> /PM	Micropartículas magnéticas bioconjugadas com anticorpos policlonais
Ab <sub>2</sub> /PM/HRP	Micropartículas magnéticas bioconjugadas com anticorpos policlonais e enzima peroxidase
Ag	Antígeno
ALP	Fosfatase alcalina (do inglês <i>alkaline phosphatase</i> )
anti-CP-CTV	Anticorpo específico para proteína CP-CTV
anti-TREA	Anticorpo específico para proteína TREA
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathione
AuNR	Nanobastões de ouro
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i> )
CP-CTV	Proteína do capsídeo do CTV
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
CV	Voltametria cíclica (do inglês <i>cyclic voltammetry</i> )
DE $\mu$ D	Dispositivo eletroquímico microfluídico descartável
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês <i>Differential</i>

	<i>pulse voltammetry</i> )
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDX	Espectrometria de raios-X por dispersão em energia (do inglês <i>energy dispersive x-ray</i> )
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
ET	Eletrodo de trabalho
f	Fento ( $10^{-15}$ )
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
rGO	Óxido de grafeno reduzido (do inglês <i>reduced graphene oxide</i> )
GSH	Glutationa
H <sub>2</sub> Q	Hidroquinona
HEPES	Ácido ((N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-etanosulfônico))
HRP	Enzima peroxidase (do inglês <i>Horseradish peroxidase</i> )
I	Corrente
I <sub>p</sub>	Corrente de pico
LD	Limite de detecção
Log	Logaritmo
m	Mili ( $10^{-3}$ )
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
n	Nano ( $10^{-9}$ )
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio

NHS	N-hidroxisuccinimida
NPMs	Nanopartículas magnéticas
1-NPP	1-naftil fosfato (do inglês <i>1-naphthylphosphate</i> )
ORFs	Fases de leitura aberta (do inglês <i>open reading frames</i> )
p	Pico ( $10^{-12}$ )
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PBS-TW	Tampão fosfato com Tween
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> )
PDDA	Cloreto de polidialildimetilamônio (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium) chloride</i> )
PEEK	Poliéter éter cetona (do inglês, <i>polyether ether ketone</i> )
PM	Partícula magnética
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês <i>square wave voltammetry</i> )
SPCE	Eletrodo de carbono serigrafado (do inglês <i>screen printed carbon electrode</i> )
TREA	Trealase
TRIS	Tri(hidroximetil) aminometano
TW	Tween-20
V	Volt
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
μ	micro ( $10^{-6}$ )

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Comparação dos imunoensaios para detecção de CP-CTV.....	45
TABELA 4.1 - Figuras de mérito dos imunoensaios eletroquímicos desenvolvidos para detecção de TREA.....	74
TABELA 5.1 - Comparação das áreas eletroquimicamente ativas para os eletrodos sem modificação (carbono) e modificados com rGO, AuNR e rGO/AuNR obtidos a partir dos voltamogramas da figura 5.6. ....	93

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 - A) Esquema representativo da organização do genoma viral *Citrus tristeza virus*<sup>12</sup>. B) Principais sintomas de plantas infectadas pelo CTV em diferentes combinações de copa/porta-enxerto: declínio (esquerda), amarelecimento (meio) e caneluras (direita)<sup>10</sup>. ..... 4
- FIGURA 1.2 - Lesões características do cancro cítrico em folha, ramo e frutos infectados por Xcc, da esquerda para a direita<sup>14</sup>. ..... 6
- FIGURA 1.3 - Esquema de um biossensor usando diferentes biorreceptores para detecção da molécula alvo. Adaptado de Khater et al. (2017)<sup>35</sup>. ..... 11
- FIGURA 1.4 - Representação esquemática de estratégias para detecção de biomarcadores proteicos usando partículas magnéticas empregadas na A) captura e pré-concentração do analito<sup>93</sup>, ou, alternativamente, B) como suporte para milhares de anticorpos e marcadores enzimáticos em imunoenaios do tipo sanduíche<sup>95</sup>. ..... 18
- FIGURA 3.1 - Ilustração esquemática das etapas necessárias para o imunoenensaio proposto: (1) construção do dispositivo microfluídico descartável; (2) etapa de modificação da superfície do eletrodo de trabalho com anticorpos monoclonais (Ab<sub>1</sub>); (3) preparação do imunoconjugado contendo partículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais e enzimas HRP; e (4) captura do biomarcador CP-CTV usando o imunoconjugado e formação do imunoenensaio do tipo sanduíche. .... 26
- FIGURA 3.2 - Representação esquemática da construção dos eletrodos de carbono serigrafados: (a) transferência da máscara de vinil para a folha de transparência; (b) deposição da tinta condutora de carbono sobre o substrato; (c) remoção do vinil adesivo após cura da tinta; (d) delimitação da área dos eletrodos com uma máscara de vinil contendo 8 orifícios; e (f) obtenção do eletrodo de pseudo-referência após aplicação da tinta de Ag|AgCl. .... 28
- FIGURA 3.3 - Ilustração esquemática da montagem do DE $\mu$ D usando os substratos com os eletrodos e um cartão adesivo de dupla-face. .... 29
- FIGURA 3.4 - Esquema com as etapas envolvidas na imobilização covalente dos anticorpos monoclonais anti-CP-CTV sobre os eletrodos de carbono. .... 30
- FIGURA 3.5 - Representação das etapas de imobilização das partículas magnéticas carboxiladas com os anticorpos policlonais e enzima HRP após a ativação com EDC/NHS. .... 32

- FIGURA 3.6 - Diagrama esquemático da etapa de captura do biomarcador CP-CTV após a adição de  $Ab_2/PM/HRP$  à solução da amostra, seguida das etapas de incubação, separação magnética e lavagens com tampão PBS..... 33
- FIGURA 3.7 - Imagens de MEV obtidas para A) a superfície do eletrodo sem modificação, B) para as AuNP-GSH com seu histograma da distribuição do tamanho (inserção) e C) AuNPs-GSH na superfície do eletrodo com D) confirmação de sua composição química por EDX..... 35
- FIGURA 3.8 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos de carbono (a) sem modificação em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, e (b) sem modificação, (c) modificado com PDDA e com (d) PDDA/AuNP em  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ferroceno monocarboxílico contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Estudo de diferentes velocidades de varredura ( $25 - 400 \text{ mV s}^{-1}$ ) para eletrodo de carbono B) sem modificação e C) modificado com PDDA/AuNP. D) Correlação linear entre a corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para os eletrodos de carbono correspondentes às figuras B e C..... 37
- FIGURA 3.9 - Espectros de absorção UV-Vis da A) solução contendo anticorpo  $Ab_2$  e enzima HRP e B) da suspensão contendo PM,  $Ab_2/PM$  e  $Ab_2/PM/HRP$ . 40
- FIGURA 3.10 - Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP com seu substrato  $H_2O_2$  e hidroquinona como mediador eletroquímico, evidenciando a resposta eletroquímica do produto formado..... 41
- FIGURA 3.11 - A) Estudo do tempo de interação dos anticorpos policlonais com a proteína CP-CTV e B) influência do tempo de formação do sanduíche no dispositivo microfluídico; sob condições:  $[CP-CTV] = 19,5 \text{ fg mL}^{-1}$ ,  $[Ab_1] = 10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $[Ab_2] = 10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ..... 43
- FIGURA 3.12 - A) Sinais transientes de corrente obtidos para soluções padrão de CP-CTV em PBS (pH 7,4) a  $-0,2 \text{ V}$  vs. pseudo referência (Ag|AgCl) e solução de detecção de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $H_2Q/H_2O_2$  e B) curva analítica para CP-CTV ( $I \text{ (nA)} \times \log [CP-CTV]$ ). ..... 44
- FIGURA 3.13 - A) Avaliação da estabilidade do dispositivo após diferentes tempos de armazenamento usando solução  $19,5 \text{ fg mL}^{-1}$  de CP-CTV em PBS (pH 7,4). B) Especificidade do imunossensor eletroquímico para tampão PBS 7,4 (branco), plantas não infectadas com CTV (amostras controle) e soluções de patógenos de citros: *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* e *Guignardia citricarpa*. Os sinais eletroquímicos foram medidos com a injeção de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução de  $H_2O_2/H_2Q$ . ..... 47
- FIGURA 3.14 - Gráficos de barras para as concentrações de CP-CTV em amostras de plantas saudáveis e infectadas com o *Citrus tristeza virus* usando o DE $\mu$ D e o método comparativo ELISA. .... 49

- FIGURA 4.1 - Representação das etapas de preparação do imunossensor eletroquímico para detecção da TREA, sendo A) a imobilização de anti-TREA sob os eletrodos de trabalho do dispositivo microfluídico, B) as etapas para obtenção do biconjugado Ab<sub>2</sub>/NPM/HRP, C) a captura e isolamento da proteína TREA usando o Ab<sub>2</sub>/NPM/HRP e D) a formação da estrutura do tipo sanduíche sob o eletrodo para posterior análise eletroquímica. .... 55
- FIGURA 4.2 - Esquema das etapas necessárias para obtenção do imunoenensaio não-enzimático: (1) Preparação do conjugado contendo nanopartículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais de captura (Ab<sub>2</sub>); (2) imunoconjugação das AuNPs com anti-TREA (Ab<sub>2</sub>); (3) captura do biomarcador TREA com Ab<sub>2</sub>/NPMs e (4) formação da estrutura tipo sanduíche nas NPMs e posterior detecção eletroquímica. .... 58
- FIGURA 4.3 - Representação das etapas para conjugação das NPMs com anti-TREA, usando os reagentes EDC/NHS para ativar os grupos carboxilas e aumentar o rendimento da ligação amida formada. .... 59
- FIGURA 4.4 - Esquema representativo da estratégia de bioconjugação das AuNPs com Ab<sub>2</sub>. .... 60
- FIGURA 4.5 - Etapas de interação do imunoenensaio proposto. A) Captura da proteína TREA após a adição do conjugado Ab<sub>2</sub>-NPM à solução padrão ou amostra, juntamente com as etapas de separação magnética e lavagem. B) Formação da estrutura do tipo sanduíche usando TREA/Ab<sub>2</sub>-NPM e as nanopartículas marcadas com anti-TREA após tempo de incubação. .... 61
- FIGURA 4.6 - Caracterização das NPMs por A) microscopia eletrônica de transmissão; B) distribuição do diâmetro das nanopartículas pelo software *ImageJ*; c) espectros de energia dispersiva de raio-x das NPMs sem modificação, evidenciando os picos referente ao ferro e D) espectros de infravermelho com transformada de Fourier para NPMs (a) não modificados e (b) modificadas com citrato. .... 63
- FIGURA 4.7 - A) Caracterização morfológica das AuNPs por microscopia eletrônica de transmissão; figura inserida: distribuição do diâmetro das nanopartículas usando software *ImageJ*. B) Espectros de absorção do visível das (a) AuNPs, (b) AuNPs conjugadas com anti-TREA e (c) solução de anti-TREA. .... 65
- FIGURA 4.8 - Otimizações das etapas do imunossensor com HRP para detecção de TREA (1,0 pg mL<sup>-1</sup>): A) resposta das diferentes concentrações de anti-TREA na superfície do eletrodo; B) estudo do tempo de captura da proteína usando o bioconjugado; C) efeito do tempo de formação do imunossanduíche e D) respostas amperométricas para diferentes vazões da solução de detecção (solução mista contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>Q/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). .... 67

- FIGURA 4.9 - Otimização das etapas do imunoenensaio com AuNPs para detecção da TREA ( $1,95 \text{ pg mL}^{-1}$ ): A) Estudo de diferentes concentrações de anti-TREA para conjugação com as AuNPs; B) estudo da concentração de anti-TREA imobilizadas na superfície das NPMs; avaliação dos tempos de C) captura da proteína TREA e D) formação do sanduíche. .... 71
- FIGURA 4.10 - A) Respostas dos sinais transientes para diferentes concentrações da proteína TREA em PBS (pH 7,4) a  $-0,2 \text{ V}$  vs. pseudo referência  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  após a injeção da mistura de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}/\text{H}_2\text{O}_2$  e B) curva analítica para TREA ( $I \text{ (nA)} \times \log [\text{TREA}]$ ). .... 73
- FIGURA 4.11 - A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir da resposta eletroquímica das AuNPs para diferentes concentrações de TREA e B) curva analítica para TREA ( $I \text{ (nA)} \times \log [\text{TREA}]$ ). .... 74
- FIGURA 4.12 - Gráfico de barras comparando os resultados obtidos com um imunoenensaio eletroquímico enzimático, não-enzimático e teste Elisa para detecção de TREA em amostras de plantas cítricas..... 77
- FIGURA 5.1 - Esquema representativo do imunossensor multiplexado para detecção eletroquímica dos biomarcadores CP-CTV e TREA, especificando a etapa de modificação da superfície do eletrodo e imobilização dos anti-CP-CTV ( $\text{Ab}_1$ ) e anti-TREA ( $\text{Ab}_2$ ); preparação do bioconjugado contendo partículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais e enzimas ALP; captura dos biomarcadores CP-CTV e TREA usando o bioconjugado e posterior formação do imunoenensaio multiplexado do tipo sanduíche..... 83
- FIGURA 5.2 - Representação da imobilização do anti-CP-CTV e anti-TREA na superfície dos eletrodos de trabalho modificados com nanobastões de ouro. .... 85
- FIGURA 5.3 - Esquema das etapas de imobilização dos anticorpos policlonais específicos para CP-CTV e TREA e também da enzima fosfatase alcalina nas PMs carboxiladas. .... 86
- FIGURA 5.4 - A) Representação da etapa de captura das proteínas CP-CTV e TREA após interação com seus respectivos bioconjugados  $\text{Ab}_2\text{-PM-ALP}$ . B) Formação do imunoenensaio do tipo sanduíche na superfície do eletrodo e o sinal eletroquímico gerado a partir da injeção da solução de detecção contendo 1-NPP. .... 88
- FIGURA 5.5 - Comparação da resposta voltamétrica para oxidação do 1-naftol na (a) ausência e (b) presença da ALP imobilizada na superfície do eletrodo de carbono A) sem modificação e modificado com B) rGO, C) AuNR e D) rGO-AuNR. Condições:  $[\text{ALP}] = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $[\text{1-NPP}] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . .... 90
- FIGURA 5.6 - Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (de 50 a  $400 \text{ mV s}^{-1}$ ) para o eletrodo de carbono A) sem modificação, modificado com

B) óxido de grafeno reduzido, C) AuNR e D) rGO/AuNR, usando  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ferroceno monocarboxílico em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. .... 92

FIGURA 5.7 - Imagens de MEV para eletrodo de carbono A) sem modificação e B) modificado com nanobastões de ouro, e os mapas de cores em quantidades de C, Cl e Au por EDS. .... 94

FIGURA 5.8 - Esquema da reação catalítica da fosfatase alcalina com seu substrato 1-naftil fosfato e etapa de oxidação eletroquímica do produto formado. .... 95

FIGURA 5.9 - Parâmetros avaliados: A) influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizadas nas partículas magnéticas; B) concentração de substrato 1-NPP e C) estudo do tempo de formação do 1-naftol nas respostas de DPV para o imunossensor do tipo sanduíche para TREA. Condições:  $[\text{TREA}] = 12,5 \text{ pg mL}^{-1}$ ,  $[\text{Ab}_2]_{\text{eletrodo}} = 20,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $[\text{Ab}_2]_{\text{PM}} = 10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , usando tampão TRIS (pH 9,6) como solução carreadora. .... 96

FIGURA 5.10 - Curva de calibração para A) CP-CTV e B) TREA obtidos com o imunossensor multiplexado a partir da resposta eletroquímica da reação de hidrólise do 1-naftil fosfato catalisada pela ALP ( $I \text{ (nA)} \times \log [\text{proteína}]$ ). .... 99

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES APLICADOS NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS EM CULTIVARES. A citricultura é uma das principais atividades agrícolas, sendo o Brasil o maior produtor de citros do mundo. Considerando a relevância desta cultura e seu constante crescimento, algumas doenças podem afetar significativamente a produtividade mundial. As doenças Tristeza dos citros e cancro cítrico, causadas pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), respectivamente, são intensivamente monitoradas, uma vez que a erradicação das plantas é a principal forma de controle. Deste modo, é de extremo interesse o desenvolvimento de procedimentos analíticos simples, rápidos, específicos e de baixo custo para detecção desses fitopatógenos em estágios iniciais. Nesse sentido, esse trabalho propôs o desenvolvimento de imunoenaios eletroquímicos para determinação da proteína do capsídeo do CTV (CP-CTV) e trealase (TREA) para o diagnóstico da Tristeza dos citros e cancro cítrico, respectivamente. Esses imunoenaios do tipo sanduíche utilizaram eletrodos serigrafados e partículas magnéticas com elementos de biorreconhecimento imobilizados em sua superfície, que auxiliaram na captura, separação e pré-concentração do analito. A primeira abordagem foi o desenvolvimento de um dispositivo descartável microfluídico para detectar a proteína CP-CTV, baseado na reação redox da hidroquinona/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, devido à presença da enzima peroxidase (HRP). O procedimento apresentou boa linearidade ( $r^2 = 0.98$ ), com faixa linear de trabalho de 2,0 fg mL<sup>-1</sup> a 10,0 pg mL<sup>-1</sup> e limite de detecção de 0,3 fg mL<sup>-1</sup>. Na segunda abordagem, foi explorada a TREA como um potencial biomarcador proteico para detecção do cancro cítrico, por meio de um imunoenaiio enzimático e outro não-enzimático. Assim, o sistema enzimático utilizou a HRP como marcador eletroquímico, enquanto o imunoenaiio não-enzimático usou nanopartículas de ouro para essa mesma função. Comparativamente, os dois procedimentos apresentaram bons resultados, nos quais foram obtidas ótimas linearidades para as faixas de concentração de 25,0 fg mL<sup>-1</sup> a 10,0 pg mL<sup>-1</sup> e 1,0 - 62,5 pg mL<sup>-1</sup> para o imunoenaiio enzimático e não-enzimático, respectivamente. Além disso, os limites de detecção para os dois sistemas desenvolvidos foram similares, com valores de 19,0 e 16,0 fg mL<sup>-1</sup>. A terceira abordagem envolveu um imunossensor para determinação multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA usando um dispositivo microfluídico. Nesta estratégia de detecção multiplexada, o uso da enzima fosfatase alcalina como marcador eletroquímico promoveu boa versatilidade ao procedimento em relação aos imunoenaios usuais. Os intervalos lineares das curvas de calibração para CP-CTV e TREA foram de 0,3 a 5,1 pg mL<sup>-1</sup> e 0,8 a 12,5 pg mL<sup>-1</sup>, com limites de detecção de 0,1 pg mL<sup>-1</sup> e 0,6 pg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Finalmente, a primeira e a segunda abordagem foram aplicadas em amostras de plantas sadias e infectadas, seguida pela comparação com o procedimento ELISA, não havendo diferença significativa entre os métodos ao nível de 95% de confiança, o que demonstrou a aplicabilidade das estratégias. Além disso, todos os dispositivos desenvolvidos apresentaram boa precisão, alta sensibilidade e baixo custo, sendo alternativas viáveis para detecção precoce dessas doenças.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOASSAYS FOR THE DETERMINATION OF BIOMARKERS APPLIED IN THE DIAGNOSIS OF DISEASES IN CULTIVARS. Citrus production is one of the world's main agricultural activities, and Brazil is its largest producer. Considering the importance of this culture and its constant growth, some diseases may significantly affect world productivity. The Tristeza disease and the citrus canker, caused by the *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), respectively, are intensively monitored, since plant eradication is the main form of control. Thus, it is of the extreme interest to develop simple, fast, specific and low-cost analytical procedures for detecting these phytopathogens in the early stages. In this sense, this work proposed the development of electrochemical immunoassays for the determination of CTV capsid protein (CP-CTV) and trehalase (TREA) for the diagnosis of Tristeza disease and citrus canker, respectively. These sandwich-type immunoassays used screen-printed carbon electrodes and magnetic particles with biorecognition elements immobilized on their surface, which allowed the capture, separation, and pre-concentration of the analyte. The first approach was the development of a disposable microfluidic device to detect the CP-CTV protein, based on the redox reaction of hydroquinone/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, that was enzymatically generated from the HRP label. The procedure presented a good linearity ( $r^2 = 0.98$ ), with a linear working range of 2.0 fg mL<sup>-1</sup> to 10.0 pg mL<sup>-1</sup>, and a detection limit of 0.3 fg mL<sup>-1</sup>. In the second approach, trehalase (TREA) was explored as a potential biomarker for the detection of citrus canker, employing an enzymatic and another non-enzymatic immunoassay. Thus, the enzymatic system used HRP as an electrochemical label, while the non-enzymatic immunoassay used gold nanoparticles for this same function. Comparatively, the two procedures presented good results, in which excellent linearities were obtained for the concentration ranges of 25.0 fg mL<sup>-1</sup> to 10.0 pg mL<sup>-1</sup> and 1.0 – 62.5 pg mL<sup>-1</sup> for the enzymatic and non-enzymatic immunoassay, respectively. Besides, the detection limits for the two systems developed were similar, with values of 19.0 and 16.0 fg mL<sup>-1</sup>. The third approach involved an immunosensor for multiplexed determination of CP-CTV and TREA proteins using a microfluidic device. In this multiplexed detection strategy, the use of the alkaline phosphatase enzyme as a label promoted good versatility and selectivity to the procedure when compared to the usual immunoassays. The linear intervals of the calibration curves for CP-CTV and TREA were 0.3 to 5.1 pg mL<sup>-1</sup> and 0.8 to 12.5 pg mL<sup>-1</sup>, with detection limits of 0.1 and 0.6 pg mL<sup>-1</sup>, respectively. Finally, the first and second approaches were applied to samples of healthy and infected plants, followed by comparison with the ELISA-based procedure, with no significant difference between the methods at the 95% confidence level, which demonstrated the applicability of the strategies. Besides, all devices developed showed good accuracy, high sensitivity, and low cost, hence being viable alternatives for the early detection of these diseases.

## SUMÁRIO

<i>Capítulo 1</i> .....	1
1 - INTRODUÇÃO .....	2
1.1 - CITROS: PRODUÇÃO, IMPORTÂNCIA NACIONAL E DESAFIOS .2	
1.1.1 - Tristeza dos citros.....	3
1.1.2 - Cancro cítrico .....	5
1.2 - CONTROLE E MÉTODOS DE DETECÇÃO .....	6
1.3 - BIOMARCADORES.....	8
1.4 - BIOSSENSORES .....	10
1.4.1 - Biossensores desenvolvidos para detecção das doenças Tristeza dos citros e Cancro cítrico .....	12
1.5 - DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS .....	15
1.6 - USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	16
<i>Capítulo 2</i> .....	20
2 - OBJETIVO .....	21
<i>Capítulo 3</i> .....	22
3 - DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DESCARTÁVEL BASEADO EM IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DO <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> EM AMOSTRAS DE PLANTAS CÍTRICAS.....	23
3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
3.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.2.1 - Reagentes e materiais .....	23
3.2.2 - Instrumentação.....	24
3.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais.....	25
3.2.3.1 - Solução tampão PBS .....	25
3.2.3.2 - Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona ...	25
3.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor eletroquímico .....	26
3.2.4.1 - Fabricação do DE $\mu$ D .....	27
3.2.4.2 - Imobilização dos anticorpos monoclonais na superfície dos eletrodos.....	29
3.2.4.3 - Imobilização do anticorpo policlonal e da enzima HRP na superfície da partícula magnética .....	31

3.2.4.4 - Estudo da resposta eletroquímica do DE $\mu$ D e construção da curva de calibração para CP-CTV .....	32
3.2.5 - Preparação das amostras de plantas para análise via imunoenensaio desenvolvido .....	34
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.3.1 - Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos construídos .....	35
3.3.2 - Caracterização do bioconjugado Ab <sub>2</sub> /PM/HRP por UV-Vis .....	39
3.3.3 - Otimização das condições experimentais.....	41
3.3.4 - Curva de calibração para CP-CTV usando o imunoenensaio desenvolvido .....	43
3.3.5 - Estudo da precisão, repetitividade, estabilidade e potenciais interferentes do imunossensor .....	46
3.3.6 - Aplicação do imunoenensaio em amostras de citros infectadas com CTV.....	48
3.4 - CONCLUSÃO PARCIAL.....	50
<i>Capítulo 4</i> .....	51
4 - DESENVOLVIMENTO E COMPARAÇÃO DE IMUNOENSAIOS ENZIMÁTICO E NÃO-ENZIMÁTICO VISANDO A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO CANCRO CÍTRICO .....	52
4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
4.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.2.1 - Reagentes e materiais .....	52
4.2.2 - Instrumentação.....	53
4.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais.....	53
4.2.3.1 - Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com citrato .....	53
4.2.3.2 - Síntese e modificação das nanopartículas magnéticas .....	54
4.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor enzimático .....	55
4.2.5 - Desenvolvimento do imunoenensaio não-enzimático.....	57
4.2.5.1 - Conjugação das nanopartículas magnéticas com anti-TREA .....	58
4.2.5.2 - Imunoconjugação das AuNPs com anti-TREA.....	59
4.2.5.3 - Captura do biomarcador TREA com Ab <sub>2</sub> /NPMs e formação do imunoenensaio do tipo sanduíche.....	60
4.2.5.4 - Detecção eletroquímica usando DPV.....	61
4.2.6 - Preparação das amostras de plantas.....	62

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.3.1 - Caracterização das NPMs.....	62
4.3.2 - Caracterização das AuNPs e de sua conjugação com Ab <sub>2</sub> .....	64
4.3.3 - Otimização dos parâmetros experimentais.....	66
4.3.3.1 - Otimização do imunossensor enzimático.....	66
4.3.3.2 - Otimização do imunoenensaio não-enzimático.....	69
4.3.4 - Desempenho analítico dos imunoenensaiois propostos.....	72
4.3.5 - Determinação de TREA em amostras de plantas cítricas.....	76
4.4 - CONCLUSÃO PARCIAL.....	78
<i>Capítulo 5</i> .....	79
5 – DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PARA DETERMINAÇÃO MULTIPLEXADA DAS PROTEÍNAS CP-CTV E TREA EM CULTIVARES DE CITROS USANDO A ALP COMO MARCADOR ELETROQUÍMICO.....	80
5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	80
5.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	80
5.2.1 - Reagentes e materiais.....	80
5.2.2 - Instrumentação.....	81
5.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais.....	81
5.2.3.1 - Síntese dos nanobastões de ouro.....	81
5.2.3.2 - Preparação do rGO-AuNR.....	82
5.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor multiplexado.....	82
5.2.4.1 - Imobilização de anti-CP-CTV e anti-TREA no arranjo de eletrodos.....	84
5.2.4.2 - Preparação dos bioconjugados anti-CP-CTV-PM-ALP e anti-TREA-PM-ALP.....	85
5.2.4.3 - Formação do imunoenensaio multiplexado.....	87
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.3.1 - Estudo do uso de diferentes materiais na superfície do eletrodo.....	89
5.3.2 - Caracterização dos eletrodos de carbono modificados com AuNRs.....	93
5.3.3 - Otimização dos parâmetros experimentais.....	94
5.3.4 - Desempenho analítico do imunossensor multiplexado.....	98
5.4 - CONCLUSÃO PARCIAL.....	100
<i>Capítulo 6</i> .....	101
6 - CONCLUSÕES FINAIS.....	102

<i>Capítulo 7</i> .....	105
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	106

# ***INTRODUÇÃO***

## ***Capítulo 1***

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - CITROS: PRODUÇÃO, IMPORTÂNCIA NACIONAL E DESAFIOS

A produção de citros é uma das principais atividades agrícolas do mundo. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês *United States Department of Agriculture*), o Brasil, a China, a União Europeia e os Estados Unidos possuem mais de 70% do mercado mundial de citros, com destaque para o Brasil que é o maior produtor desde o início da década de noventa<sup>1</sup>. Dentre as regiões brasileiras que cultivam plantas cítricas, o cinturão citrícola de São Paulo e o Triângulo/Sudoeste Mineiro possuem uma cadeia produtiva fortemente estabelecida. Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), a área plantada com laranjas para essas duas regiões chega a 408.825 hectares, e a estimativa para a safra de laranja 2019/2020 é de 388 milhões de caixas (40,8 kg/caixa), o que corresponde a um aumento na produção de cerca de 20% em relação à média dos últimos dez anos<sup>2,3</sup>. Economicamente, esse setor movimentava mais de US\$ 14,5 bilhões, gerando cerca de US\$ 6,5 bilhões de produto interno bruto e 200 mil empregos diretos e indiretos<sup>4</sup>.

Apesar do crescimento contínuo dessa atividade, desafios significativos estão associados à preservação e manutenção saudável da produção de citros. Entre os vários outros desafios a serem enfrentados, certas doenças possuem alto potencial de danos, o que é considerado um problema global para o mercado desse tipo de cultura<sup>3,5</sup>. Nesse contexto, as doenças Tristeza dos citros e o cancro cítrico se destacam por serem altamente destrutivas e capazes de infectar praticamente todas as espécies citrícolas. Além disso, ambas as doenças possuem a erradicação da cultura como a

principal forma de controle, indicando a relevância no diagnóstico precoce de tais doenças.

### 1.1.1 - Tristeza dos citros

Um dos importantes patógenos que afetam a cultura cítrica é o *Citrus tristeza virus* (CTV), responsável pela doença Tristeza dos citros<sup>6,7</sup>. Esse vírus infecta praticamente todas as espécies cítricas de importância econômica, reduzindo significativamente a produtividade, a qualidade e a comercialização dos frutos. Possivelmente originada da Ásia, estima-se que a doença Tristeza tenha devastado milhões de árvores cítricas em todo o mundo, principalmente em culturas que utilizam mudas com porta-enxertos de laranja-azedo (espécie mais suscetível à doença). No Brasil e na Argentina, foi registrada a morte ou improdutividade de cerca de 30 milhões de árvores, e de modo geral, as perdas econômicas relacionadas a essa doença alcançam valores próximos de US\$ 5 milhões por 5.500 hectares por ano<sup>8</sup>. Atualmente, a tristeza dos citros, que é uma doença endêmica, se encontra difundida em muitas regiões do país.

O CTV, pertencente à família do *Closteroviridae* e do gênero dos *closterovirus*, é considerado o maior vírus de plantas e sua estrutura está representada na figura 1.1 A. Em geral, ele pode ser transmitido (i) mediante mudas, borbulhas ou partes de plantas infectadas, (ii) por plantas parasitas, ou ainda (iii) pelos vetores *Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii*, entre outros<sup>6,9,10</sup>. A depender do vetor, podem existir variações na capacidade de transmissibilidade das estirpes, ocasionando uma recombinação genética, e conseqüentemente, causando uma alteração na população do vírus. Com isso, as plantas infectadas por CTV podem exibir sintomas que variam de leve a grave, dependendo da combinação copa/porta-enxerto, capacidade de multiplicação do vírus, severidade do isolado e também das condições climáticas<sup>6,7,11,12</sup>.

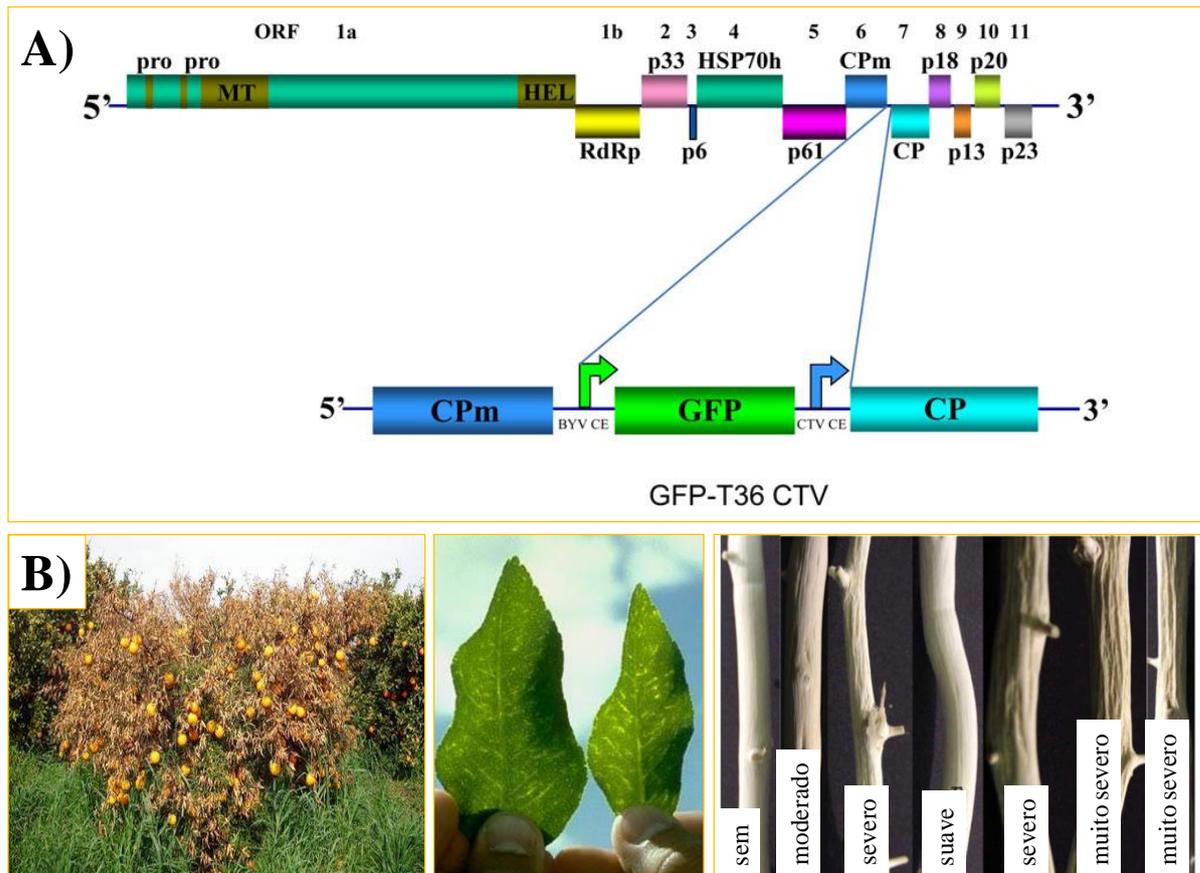


FIGURA 1.1 - A) Esquema representativo da organização do genoma viral *Citrus tristeza virus*<sup>12</sup>. B) Principais sintomas de plantas infectadas pelo CTV em diferentes combinações de copa/porta-enxerto: declínio (esquerda), amarelecimento (meio) e caneluras (direita)<sup>10</sup>.

Os principais sintomas da doença Tristeza dos citros são declínio (lento ou rápido), nanismo da planta, amarelecimento geral (*seedling yellows*), caneluras (*stem pitting*) ou até mesmo pode evoluir de forma assintomática (figura 1.1 B). O declínio ocorre principalmente em espécies mais sensíveis, na qual há uma incompatibilidade entre copa e porta-enxerto, reduzindo o fluxo de carboidratos para planta, e conseqüentemente, não ocorre absorção de água e nutrientes do solo, ocasionando necrose dos tubos crivados, podridão das raízes, perda de folhas e frutos e eventual morte da planta. O sintoma de amarelecimento está associado aos isolados severos do CTV, apresentando folhas amarelas ou mesmo brancas, folhas retorcidas e nanismo. Já o sintoma de

canelura afeta o crescimento radial do caule, diminuindo o rendimento devido às depressões formadas no lenho<sup>7,11,12</sup>.

### 1.1.2 - Cancro cítrico

O Cancro cítrico também é uma doença endêmica e, apesar de relatos de incidência no Brasil desde 1957, o aumento da disseminação dessa doença ocorreu a partir do ano de 2009, com a alteração na legislação do controle de cancro cítrico no estado de São Paulo, que promoveu menor rigor nas inspeções oficiais e na erradicação de plantas infectadas. Com esta alteração, a doença apresentou um acelerado crescimento de 893% entre 2009 e 2012, com o índice de 5% dos talhões contaminados<sup>13-15</sup>. Atualmente, com a adoção da resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº. 10 de 20/02/2017 (Resolução SAA 10), que permite a manutenção de plantas sintomáticas nos pomares, a incidência de cancro cresceu 28% entre 2018 e 2019 e está presente em 29,3 milhões (15,01%) de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro<sup>16,17</sup>. Assim, a rápida disseminação nos últimos anos e os prejuízos econômicos gerados fazem com que esta doença também seja considerada um dos principais problemas fitossanitários no setor citrícola<sup>13,15</sup>.

O patógeno bacteriano *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) é o principal causador dessa doença. Pertencente ao gênero das *Xanthomonas*, grupo bastante importante agrícola e economicamente, essa bactéria é gram-negativa, anaeróbica, com formato baciliforme e com um flagelo polar<sup>13,15,18</sup>. Apesar de existir várias formas menores da doença, a Xcc provoca danos à maioria das espécies de citros e é conhecida por apresentar a forma mais severa da doença, a cancrose A.

O cancro cítrico pode ser facilmente disseminado por ações do homem ou da própria natureza, no entanto devido à fragilidade da Xcc ao ser exposta à luz solar, a presença da bactéria em plantações não garante a

ocorrência da doença<sup>13,14</sup>. A infecção da planta acontece quando essa espécie patogênica penetra os tecidos vegetais por meio de aberturas naturais ou mecânicas, tais como ferimentos ocasionados por atrito com insetos, máquinas, grãos de areia ou partes da própria planta<sup>13-15</sup>. Os sintomas são bastante característicos e fáceis de identificar, e podem ser encontrados em folhas, frutos, caules e ramos. Inicialmente, a doença provoca lesões circulares levemente salientes, e em seguida, essas lesões tornam-se corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo (figura 1.2)<sup>18,19</sup>. Em estágio mais avançados, ocorre a ruptura da casca nos frutos, ocasionando a depreciação do produto. Além disso, sintomas mais graves incluem a desfolha de plantas, queda prematura dos frutos e morte severa de árvores<sup>13-15,18,19</sup>.



FIGURA 1.2 - Lesões características do cancro cítrico em folha, ramo e frutos infectados por Xcc, da esquerda para a direita<sup>14</sup>.

## 1.2 - CONTROLE E MÉTODOS DE DETECÇÃO

Tanto a Tristeza dos citros como o cancro cítrico não possuem tratamento, e dessa forma, estratégias para controlar e prevenir a infecção de novas árvores são imprescindíveis. Para a Tristeza dos citros, o controle da doença aumentou nos últimos anos com o desenvolvimento de porta-enxertos tolerantes e pré-imunização utilizando isolados leves de CTV<sup>9,11</sup>. Além disso, o diagnóstico da doença em novas regiões tem sido relatado periodicamente nas últimas décadas. Para a doença cancro cítrico, de modo geral, as árvores

infectadas são destruídas, bem como árvores assintomáticas localizadas em um determinado perímetro, visando evitar novas infecções e, conseqüentemente, minimizar maiores perdas econômicas<sup>13-15</sup>. No entanto para o estado de São Paulo, de acordo com a Resolução SAA 10, o controle do cancro cítrico é realizado por um conjunto de medidas de manejo que visam reduzir o impacto da doença na produção, uma vez que plantas com sintomas de cancro cítrico podem ser mantidas nos pomares<sup>17</sup>. Dentre essas medidas, podemos citar o uso de plantas resistentes, utilização de quebra-ventos e uso de bactericida cúprico<sup>14</sup>. Ainda assim, a detecção dessas doenças nos estágios iniciais é a melhor estratégia para prevenir novas infecções, pois em estágios mais avançados a única solução é a erradicação da cultura.

As principais técnicas aplicadas para o diagnóstico dessas doenças são a indexação biológica<sup>20,21</sup>, a reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>22-25</sup> e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)<sup>26-28</sup>. A indexação biológica foi umas das primeiras técnicas usadas para detecção do CTV, no entanto a imprecisão na identificação das estirpes foi um dos fatores que contribuiu para substituição por métodos moleculares<sup>29</sup>. O diagnóstico molecular é uma opção para identificar patógenos com grande proximidade genética, e assim tem sido utilizado para detectar e/ou diferenciar as estirpes do CTV e as várias espécies do gênero *Xanthomonas*<sup>29</sup>. Alternativamente, o ELISA também é utilizado para detecção de patógenos devido à alta especificidade, sensibilidade, aplicação em larga escala e, possibilidade de detecção próximos ao campo.

O ELISA consiste na interação específica antígeno-anticorpo, permitindo a detecção de pequenas quantidades de antígenos, que podem ser proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos ou hormônios<sup>30,31</sup>. A detecção da molécula alvo se dá pelo uso de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, e com posterior reação com o substrato cromogênico/fluorogênico. A mudança de cor visível ou por fluorescência indica a presença do antígeno, e a partir da intensidade de coloração/fluorescência pode haver sua quantificação<sup>30-32</sup>.

De modo geral, algumas desvantagens estão associadas a estes métodos de detecção, tais como, a necessidade de várias etapas, tempos longos para a realização das análises, são dispendiosos e, muitas das vezes não são portáteis, o que pode afetar no monitoramento do patógeno no campo ou no momento da colheita, que é uma alternativa para evitar maiores áreas a serem erradicadas e garantir a sustentabilidade agrícola<sup>33,34</sup>. Conseqüentemente, é de extrema importância o desenvolvimento de dispositivos analíticos simples, rápidos, precisos e de baixo custo, capazes de detectar precocemente essas doenças. Assim, o uso de biossensores vem ganhando destaque, pois além de atenderem a esses requisitos, são poderosas ferramentas para o controle de doenças<sup>34-36</sup>. Além disso, estudos também vêm sendo realizados envolvendo biomarcadores proteicos, pois a detecção sensível dessas substâncias é fundamental para um diagnóstico precoce e eficaz de doenças na área clínica e agrícola.

### **1.3 - BIOMARCADORES**

Dentre as várias definições encontradas para um marcador biológico (biomarcador), ele pode ser definido como: “um indicador mensurável (uma substância, uma estrutura ou um processo) encontrado em tecidos, células ou fluidos biológicos, que está diretamente relacionado à influência e predição de processos biológicos normais, patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”<sup>37</sup>. Em especial, os biomarcadores proteicos são os mais conhecidos devido à disponibilidade de uma grande variedade de instrumentação analítica para quantificá-los e detectá-los em amostras biológicas complexas. Neste trabalho, os biomarcadores utilizados são as proteínas do capsídeo (CP-CTV) e a trealase (TREA) para as doenças Tristeza dos citros e cancro cítrico, respectivamente.

Por ser o maior vírus de planta, o *Citrus tristeza virus* foi o primeiro closterovírus a ser biofísicamente caracterizado e está organizado em 12 fases de leitura aberta (ORFs- *open reading frames*). Esses ORFs possuem a característica de codificar as proteínas de replicação do vírus, proteína hidrofóbica, proteína envolvida na montagem do vírus e duas proteínas de maior e menor revestimento (CP e CPm, respectivamente)<sup>6,7,38,39</sup>. Dentre estas proteínas, a CP é crucial nessa patogênese, sendo responsável pelo revestimento de aproximadamente 97% do vírus, supressão do RNA e silenciamento do hospedeiro<sup>7,38,39</sup>. Devido a sua importância, a proteína do capsídeo foi utilizada como um dos biomarcadores deste trabalho.

O outro marcador biológico utilizado foi a enzima trealase, responsável pela catálise da reação de hidrólise da trealose. A trealose é um dissacarídeo não redutor que pode ser encontrado em bactérias, fungos, plantas e em algumas classes de animais<sup>40,41</sup>. Esse dissacarídeo desempenha papéis indispensáveis nas plantas, como a reserva de energia, a sinalização de vias metabólicas e de crescimento, e até mesmo a proteção de proteínas e membranas contra estresses ambientais<sup>40</sup>. Desta forma, alguns autores têm relatado a presença da enzima periplasmática TREA como sinalizadora às perturbações ambientais, uma vez que a bactéria *Xanthomonas* responde ao estresse imposto pelo hospedeiro durante a colonização. Até o momento, não há na literatura registro de estudos utilizando trealase para detecção deste fitopatógeno, o que torna interessante o emprego dessa proteína como biomarcador para Xcc<sup>41</sup>.

## 1.4 - BIOSSENSORES

Como mencionado anteriormente, o biossensor é uma estratégia que tem ganhado destaque devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e fácil miniaturização<sup>35,42,43</sup>. O biossensor é um dispositivo analítico que tem a capacidade de combinar a atividade seletiva de um material de biorreconhecimento (bioreceptor) com o analito de interesse, usando um transdutor para converter o sinal biológico em sinal mensurável<sup>35,42</sup>. Os componentes de um biossensor estão representados na figura 1.3. Em geral, podem ser usados como bioreceptores: anticorpos, DNAs, enzimas, aptâmeros e outros. O transdutor tem como função converter o sinal químico ou bioquímico, resultante da interação analito/bioreceptor, em um sinal eletrônico<sup>35,42,44</sup>. Transdutores eletroquímicos são os mais frequentemente utilizados nestes bioensaios, no entanto os transdutores também podem ser do tipo ópticos, piezelétricos, gravimétricos, calorimétricos entre outros. Deste modo, o tipo de material de biorreconhecimento e o transdutor irá determinar o tipo de aplicação e a sensibilidade do sistema<sup>35,42-45</sup>.

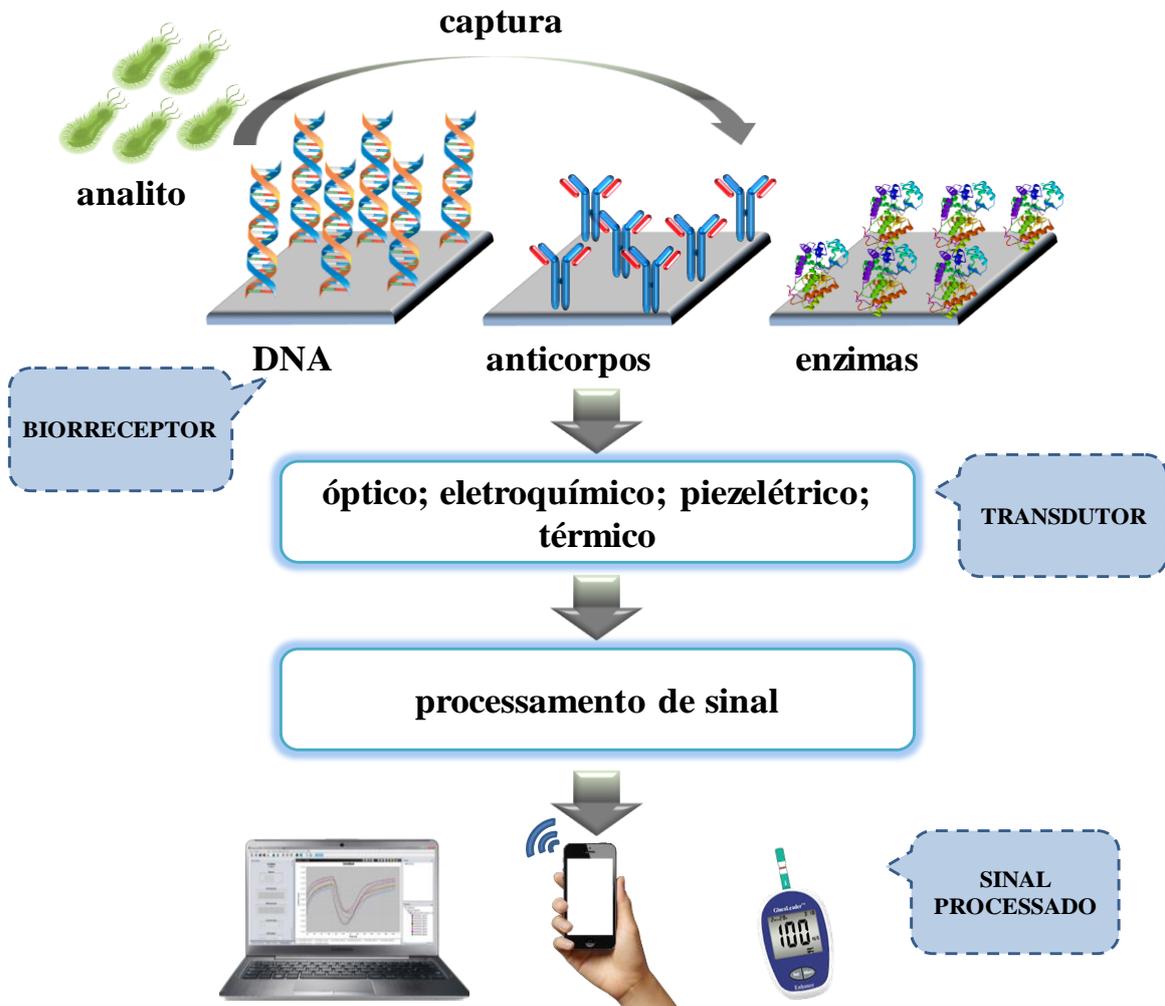


FIGURA 1.3 - Esquema de um biossensor usando diferentes biorreceptores para detecção da molécula alvo. Adaptado de Khater et al. (2017)<sup>35</sup>.

Alguns biossensores se baseiam na interação específica entre antígeno (*Ag*) e anticorpo (*Ab*), sendo estes denominados imunossensores<sup>45-49</sup>. De modo geral, a abordagem feita pelos imunossensores é uma adaptação do método ELISA, nos quais anticorpos primários são imobilizados na superfície do transdutor ou do material de suporte, visando capturar seletivamente o analito presente na amostra<sup>45-49</sup>. Basicamente, os imunossensores eletroquímicos podem detectar diretamente essa interação *Ag/Ab* (*label-free*) ou usar um marcador adicional para esse monitoramento<sup>45,47,48</sup>. A estratégia *label-free* se baseia, principalmente, na diminuição da condutividade ou no aumento da resistência do eletrodo de trabalho, tendo como vantagens: rapidez no processo de

construção e no tempo de resposta<sup>50,51</sup>. Por outro lado, a reação usando um marcador eletroquímico monitora a atividade específica deste elemento após a transferência eletrônica direta ou adição de um substrato<sup>45-48</sup>. Em geral, esses marcadores são adicionados ao sistema acoplados a anticorpos secundários, que se ligam seletivamente à proteína na superfície. A principal vantagem do uso de marcadores é sua alta sensibilidade<sup>46</sup>, parâmetro fundamental na busca por diagnósticos precoce, sendo esta estratégia utilizada neste trabalho.

Geralmente as enzimas, as moléculas eletroativas, os complexos metálicos e algumas nanopartículas metálicas podem ser utilizados como marcadores eletroquímicos<sup>46,49</sup>. Curiosamente, anticorpos conjugados com as enzimas peroxidase de rábano (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) e fosfatase alcalina (ALP, do inglês *alkaline phosphatase*) são comumente utilizados em imunossensores e imunoenaios eletroquímicos, devido ao fato de seus produtos enzimáticos serem eletroativos<sup>52,53</sup>. Alternativamente, marcadores eletroquímicos baseados em nanopartículas metálicas oferecem possibilidades interessantes para o desenvolvimento de ferramentas e instrumentação analítica, principalmente em relação à amplificação de sinal em imunoenaios eletroquímicos<sup>46,47,54,55</sup>. Uma vantagem no uso de nanopartículas como marcadores está em sua alta razão superfície/volume para a imobilização de anticorpos de captura, permitindo boa biocompatibilidade e uma resposta eletroquímica aprimorada. A seguir, serão brevemente abordados os principais biossensores descritos na literatura para detecção das doenças Tristeza dos citros e cancro cítrico.

#### **1.4.1 - Biossensores desenvolvidos para detecção das doenças Tristeza dos citros e Cancro cítrico**

Na literatura estão disponíveis alguns biossensores para detecção do *Citrus tristeza virus* ou proteínas relacionadas a esse vírus<sup>56-59</sup>. Dentre estes,

recentemente Khater e colaboradores<sup>56</sup> desenvolveram o primeiro biossensor impedimétrico sem uso de marcador para a detecção do ácido nucleico do vírus CTV. Classificado como um genossensor, esse dispositivo utilizou um eletrodo de carbono serigrafado (SPCE, do inglês *screen printed carbon electrode*) como transdutor. Além disso, nanopartículas de ouro foram depositadas eletroquimicamente na superfície do SPCE para permitir uma imobilização eficiente da sonda de DNA de fita simples (ssDNA). Após sua hibridização com a sonda de ssDNA alvo, os autores investigaram o sensor de DNA pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), usando  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  como sonda redox. A faixa linear alcançada para esse sistema foi de 1 a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DNA relacionado ao vírus CTV, com um limite de detecção (LD) de  $100 \text{ nmol L}^{-1}$ . Apesar do sensor apresentar simplicidade no processo de fabricação do dispositivo e um bom tempo de análise (aproximadamente 1 hora), essa abordagem apresenta alto LD, o que pode inviabilizar a detecção da doença em plantas pré-sintomáticas.

Alternativamente, a interação de anticorpos com a proteína do capsídeo do CTV vem sendo estudada em imunoenaios<sup>58-61</sup>. Como as figuras de mérito desses sistemas estão relacionadas à seletividade, afinidade da interação anticorpo-antígeno, marcadores de amplificação e do tipo de transdutor, diversos limites de detecção foram alcançados para cada dispositivo. Até momento, o menor LD estimado para essa proteína foi obtido utilizando um imunossensor eletroquímico desenvolvido por Haji-Hashemi et al.<sup>59</sup>. Neste sistema, também foi utilizada a estratégia *label-free* para detectar a CP-CTV. O anticorpo foi imobilizado na superfície do eletrodo de ouro, que encontrava-se modificado com monocamadas auto-organizadas, e a detecção foi realizada pela técnica da voltametria de pulso diferencial, na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ . O limite de detecção obtido foi de  $0,27 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) para a CP-CTV.

Em relação aos biossensores desenvolvidos para o cancro cítrico, poucos trabalhos foram relatados até o momento<sup>62-64</sup>. O primeiro imunossensor

foi desenvolvido por Afonso e colaboradores<sup>62</sup> (2013), no qual anticorpos específicos para proteína cisteína peptidase foram imobilizados em uma superfície de ouro do cristal de quartzo, modificadas previamente com monocamadas auto-organizadas de ácido 11-mercaptopundecanóico. Segundo os autores, este imunossensor piezelétrico, com detecção *label-free*, apresentou boa estabilidade e seletividade, com um limite de detecção de 13,0 nmol L<sup>-1</sup>. Os outros imunossensores exploraram o uso de transdutor eletroquímico, ambos desenvolvidos por Haji-Hashemi e colaboradores<sup>63,64</sup> (2018). Basicamente, os imunoenaios utilizaram uma estratégia muito similar para detecção da proteína efetora (PthA), sendo também livres de marcador eletroquímico (*label-free*). Para construção dos imunossensores, azul da Prússia e AuNPs foram eletrodepositados na superfície de um eletrodo de carbono vítreo convencional, já modificado com um nanocompósito de carbono. Os anti-PthA foram eletrostaticamente imobilizados na superfície do eletrodo modificado, e o sinal foi avaliado pela alteração na corrente de pico de redução do azul da Prússia eletrodepositado, por meio das técnicas de voltametria de onda quadrada<sup>63</sup> (SWV, do inglês *square wave voltammetry*) e voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*)<sup>64</sup>. Os limites de detecção estimados para os imunossensores pela técnica de SWV e CV foram 0,010 e 0,028 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Alguns procedimentos aqui mencionados podem trazer desafios relacionados à aplicabilidade do imunossensor. Por exemplo, a metodologia de análise de um imunossensor eletroquímico é do tipo heterogênea, e dessa forma, etapas de lavagens são necessárias após a interação antígeno/anticorpo para separação das espécies marcadas e livres<sup>45</sup>. No caso de imunoenaios com detecção *label-free*, os anticorpos imobilizados na superfície do eletrodo são responsáveis pela captura do analito, requerendo etapas de lavagens, e assim, quando submetida a muitas lavagens, a superfície do eletrodo pode sofrer defeitos em sua camada de reconhecimento, comprometendo, assim sua reprodutibilidade e eficácia. Nesta mesma etapa de captura, pode ocorrer a

contaminação ou passivação do eletrodo devido às adsorções inespecíficas de outras espécies presentes na amostra<sup>65</sup>. Desta forma, partículas magnéticas vêm sendo bastante utilizadas como materiais para imobilização do elemento de captura e como amplificadores do sinal analítico<sup>66-68</sup>.

Além disso, a utilização de células eletroquímicas clássicas é um aspecto negativo de alguns desses imunossensores, uma vez que certas desvantagens são intrínsecas a esses dispositivos convencionais. A exemplo dessas desvantagens temos: a necessidade de polir e reconstruir o sensor após cada medição; as células convencionais requerem grandes volumes de amostra/reagente; problemas relacionados ao envenenamento dos eletrodos, e por fim, difícil aplicação de um imunossensor eletroquímico convencional no campo e áreas remotas<sup>69,70</sup>. Portanto, a substituição desses imunossensores convencionais por microchips e células eletroquímicas descartáveis são ideais para aplicações no ponto de atendimento.

## **1.5 - DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS**

Dispositivos descartáveis para análise de biomarcadores em clínicas, alimentos e patógenos de plantas têm aumentado notoriamente nos últimos anos<sup>71-73</sup>. Neste sentido, plataformas simples e portáteis que exijam um mínimo de conhecimento técnico para aplicação em diagnósticos e monitoramento de doenças são algumas das vantagens oferecidas por esses sistemas. Além disso, a miniaturização e a fácil automação associadas ao menor consumo de reagentes e de amostras também podem ser alcançados com sistemas microfluídicos<sup>74,75</sup>.

Dispositivos microfluídicos podem ser obtidos por diversos métodos de fabricação, com ampla gama de materiais e ter múltiplos formatos, a depender da aplicação e das propriedades desejadas. Os materiais comumente utilizados são vidro, silício, materiais poliméricos ou papel<sup>74,76-80</sup>. Em relação às

técnicas, podem ser usadas a litografia, moldagem por injeção e estampagem a quente. Apesar das várias alternativas, grandes esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de métodos de prototipagem rápida para produzir dispositivos descartáveis e de baixo custo para imunoenaios explorando estratégias microfluídicas.

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método de prototipagem rápida baseado no uso de uma impressora doméstica de baixo custo para construir eletrodos serigrafados e dispositivos microfluídicos, para aplicações de imunoenaios<sup>81,82</sup>. Eles foram construídos usando materiais comuns de escritório, como adesivo de vinil, folha de poliéster e um cartão de dupla face, descrevendo uma alternativa simples para a prototipagem rápida de dispositivos microfluídicos. Comparando com as técnicas já mencionadas, a prototipagem rápida com base no uso de impressoras de corte é simples e rápida, não exigindo equipamentos de custo elevado ou recursos como sala limpa e pessoal qualificado<sup>74,78,79</sup>. Além disso, o custo para produção desses dispositivos é bem baixo, apresentando valores de aproximadamente US \$ 0,02. Comparativamente, o valor é cerca de 500 vezes menor que as células eletroquímicas descartáveis comerciais (US \$ 10,0)<sup>81</sup>. Os autores também comprovaram a sensibilidade, robustez e repetibilidade do sistema desenvolvido, o que faz destes dispositivos uma boa alternativa para utilização.

## **1.6 - USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Como citado anteriormente, estratégias envolvendo o uso de partículas magnéticas em imunoenaios se tornam cada vez mais significativas como uma alternativa para alcançar menores limites de detecção e melhorar o desempenho dos dispositivos. Comumente, as partículas magnéticas (PMs) são constituídas de óxidos de ferro como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , também escrito como

FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e a maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), podendo ser funcionalizadas com diversos materiais, tais como grupos carboxilas, hidroxilas, tosilas, aminas ou epóxis. As PMs possuem tamanhos que variam na escala de micrômetros a nanômetros, e, apesar de existirem formatos irregulares (formas de tubos, cubos, fios, etc), a forma esférica é a mais comum, pois apresenta as melhores propriedades hidrodinâmicas<sup>67,83</sup>. Muitas partículas magnéticas estão comercialmente disponíveis com uma variedade de grupos funcionais e tamanhos, ou podem ser facilmente sintetizadas através dos métodos de co-precipitação, sol-gel, decomposição térmica e outros<sup>84,85</sup>.

A aplicação dessas partículas em imunoenaios se dá, especialmente, pela sua grande área superficial, que permite uma eficiente imobilização dos elementos de biorreconhecimento. Assim, o número desses elementos imobilizados é significativamente maior do que os imobilizados em superfícies planas de sistemas típicos, o que confere maior sensibilidade aos imunoenaios e também reduz o volume de reagentes<sup>86,87</sup>. Além das vantagens citadas, o uso de PMs facilita a captura e pré-concentração do analito, isso porque campos magnéticos podem ser aplicados externamente por meio de ímãs, proporcionando uma eficiente e rápida separação nas etapas de incubação e lavagem, o que elimina os efeitos de matriz<sup>86-88</sup>. Em geral, o uso dessas partículas está associado a eletrodos serigrafados, já que esses dispositivos apresentam configuração planar, o que facilita a incorporação dos bioconjugados magnéticos usando um ímã localizado externamente sob a área do eletrodo<sup>67,89</sup>. Alguns trabalhos vêm destacando o desenvolvimento de magneto-imunoenaios com detecção eletroquímica usando eletrodos de carbono serigrafados descartáveis (figura 1.4 A)<sup>90-93</sup>. Genericamente, esses dispositivos apresentaram uma configuração do tipo sanduíche, com a proteína alvo capturada seletivamente por anticorpos imobilizados covalentemente sobre as partículas magnéticas, e intercalada com anticorpos policlonais conjugados com enzimas.

Outras aplicações aproveitam também o fácil manuseio e a modificação dessas partículas magnéticas, combinado a superfícies de nanopartículas de ouro, para alcançar limites de detecção na ordem de  $10^{-18}$  mol L<sup>-1</sup> (attomolar)<sup>94-96</sup>. Neste tipo de estratégia, as partículas magnéticas são bioconjugadas com anticorpos e também com marcadores enzimáticos, na qual a amplificação de sinal é alcançada pois as partículas encontram-se maciçamente decoradas, apresentando até ~500.000 de enzima e ~100.000 anticorpos por PM, com tamanho médio de 1  $\mu$ m (figura 1.4 B)<sup>95</sup>. Além disso, muitos trabalhos empregam sistemas microfluídicos para automatizar esse método de detecção, e também, realizam detecções multiplexadas para aumentar a confiabilidade do diagnóstico ou detectar simultaneamente várias doenças<sup>94-97</sup>.

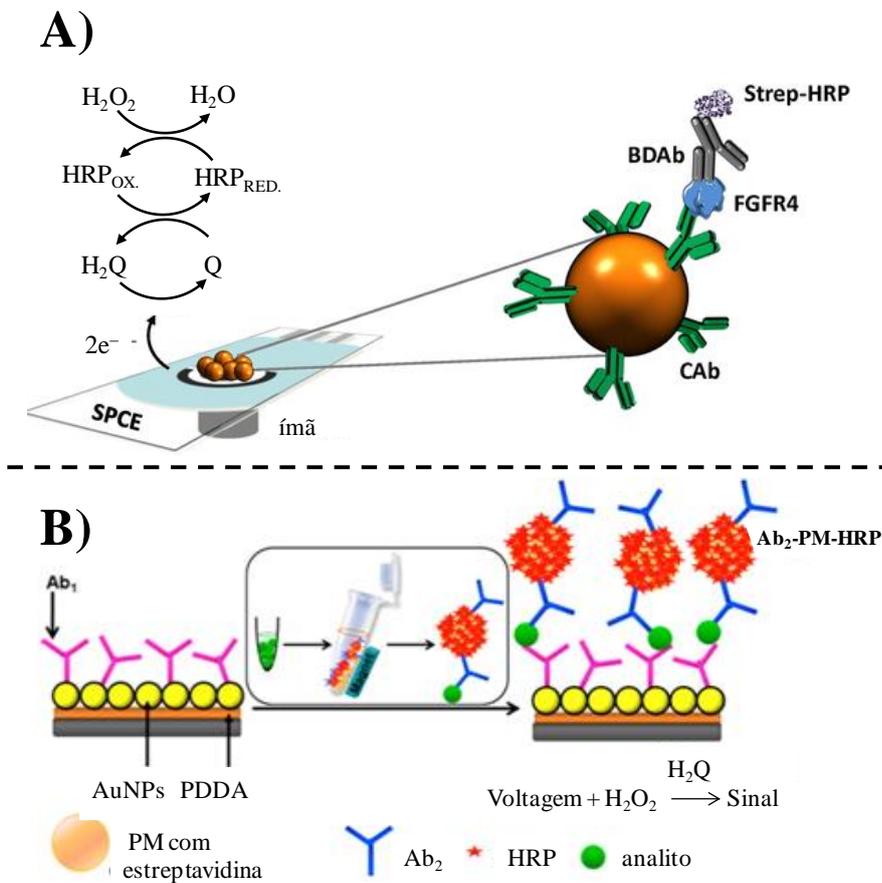


FIGURA 1.4 - Representação esquemática de estratégias para detecção de biomarcadores proteicos usando partículas magnéticas empregadas na

A) captura e pré-concentração do analito<sup>93</sup>, ou, alternativamente, B) como suporte para milhares de anticorpos e marcadores enzimáticos em imunoenaios do tipo sanduíche<sup>95</sup>.

# ***OBJETIVO***

## ***Capítulo 2***

## 2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver imunoenaios eletroquímicos para detecção individual e simultânea das doenças Tristeza dos citros (vírus *Citrus tristeza virus*) e Cancro cítrico (bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*), utilizando como biomarcadores a proteína do capsídeo e a trealase, empregando diferentes materiais para imobilização de proteínas e partículas magnéticas para amplificação de sinal.

*Dispositivo microfluídico descartável baseado em  
imunoensaio eletroquímico para detecção do  
Citrus tristeza virus em amostras de plantas  
cítricas*

*Capítulo 3*

### **3 - DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DESCARTÁVEL BASEADO EM IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DO *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EM AMOSTRAS DE PLANTAS CÍTRICAS**

#### **3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver um dispositivo eletroquímico microfluídico descartável (DE $\mu$ D) para a detecção do biomarcador CP-CTV utilizando partículas magnéticas decoradas com anticorpos e enzima HRP para a imunocaptura e detecção deste biomarcador, além do uso de nanopartículas de ouro para imobilização de proteínas na superfície do eletrodo.

#### **3.2 - PARTE EXPERIMENTAL**

##### **3.2.1 - Reagentes e materiais**

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, USA). Os reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES), polisorbato 20 (Tween 20), enzima *horseradish peroxidase* (HRP), glicina, cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA), ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, 99,9%), L-glutationa reduzida (GSH), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), ácido ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2- etanosulfônico)) (HEPES), albumina de soro bovino (BSA), tri(hidroximetil) aminometano (TRIS), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% (m/v)), hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) e ácido ferroceno monocarboxílico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

As partículas magnéticas funcionalizadas com grupos carboxilas (código 65012, concentração da suspensão de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  com diâmetro médio de  $1,0 \mu\text{m}$ ) foram obtidas da Thermo Scientific (Massachusetts, USA). A proteína do capsídeo do CTV (CP-CTV), o anticorpo monoclonal anti-CP-CTV (produzido em camundongo), o anticorpo policlonal anti-CP-CTV (produzido em coelho) e o kit do ensaio de imunoabsorção enzimática para CP-CTV foram adquiridos da Rheabiotech (Campinas, BR).

Para construção dos eletrodos, foi utilizada uma tinta de carbono (Gwent-C2160602D2) e uma tinta de prata/cloreto de prata (Gwent-C2051014P10) obtidas da Gwent Electronic Materials Ltd (Pontypool, UK). As folhas de transparências para impressora a laser, o cartão adesivo de dupla face e o adesivo Command™ 3M foram adquiridos em comércio local (São Carlos, BR).

### **3.2.2 - Instrumentação**

O design dos eletrodos foi criado usando o *software* Silhouette Studio e foram cortados com uma impressora de corte Silhouette Cameo (Silhouette, Brasil). As análises eletroquímicas foram realizadas usando um multipotenciostato portátil  $\mu\text{Stat}$  8000 da Dropsens (Astúrias, ES), e o *software* DropView 8400 foi utilizado para controle e aquisição de dados e para tratar os resultados obtidos. Um microscópio eletrônico de varredura modelo Hitachi S-4800 equipado com um espectrômetro de raios-X por dispersão em energia foi utilizado para caracterização dos eletrodos e dos materiais sintetizados em laboratório. A eficácia da modificação das partículas magnéticas com anticorpos policlonais e enzima peroxidase foi avaliada usando um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-2450) e uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

### 3.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais

#### 3.2.3.1 - Solução tampão PBS

O tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L<sup>-1</sup> foi preparado a partir de mistura de soluções contendo fosfato de sódio dibásico (0,01 mol L<sup>-1</sup>), fosfato de potássio monobásico (1,8 mmol L<sup>-1</sup>), cloreto de sódio (0,14 mol L<sup>-1</sup>) e cloreto de potássio (2,7 mmol L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para o valor desejado com uma solução de HCl.

#### 3.2.3.2 - Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona

As nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona (AuNPs-GSH) foram sintetizadas a partir da redução do ácido cloroauríco com borohidreto de sódio utilizado como agente redutor e a glutathiona como agente estabilizante<sup>98,99</sup>. Para isso, 79,0 mg de HAuCl<sub>4</sub> e 30,8 mg de L-glutathiona foram adicionados a um béquer contendo ácido acético glacial (2,0 mL) e metanol (12,0 mL), resultando em uma solução com coloração amarelo pálido. Em seguida, 6,0 mL de NaBH<sub>4</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados lentamente, e essa solução foi mantida sob agitação por 2 horas. Após esse tempo, foram realizadas filtrações e lavagens das AuNPs-GSH por centrifugação (3500 rpm) utilizando uma membrana de filtração molecular de 50 kDa, este processo foi repetido por três vezes. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de tampão HEPES (20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0) e estocado a 4 °C até sua utilização.

### 3.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor eletroquímico

O imunoenensaio do tipo sanduíche desenvolvido para CP-CTV envolveu o uso de um dispositivo eletroquímico construído com oito imunossensores com  $Ab_1$  imobilizados covalentemente em sua superfície, e de PMs decoradas com o  $Ab_2$  e HRP. O desenvolvimento do imunoenensaio compreendeu quatro etapas, que estão representadas na figura 3.1. As etapas serão descritas nas seções subsequentes.

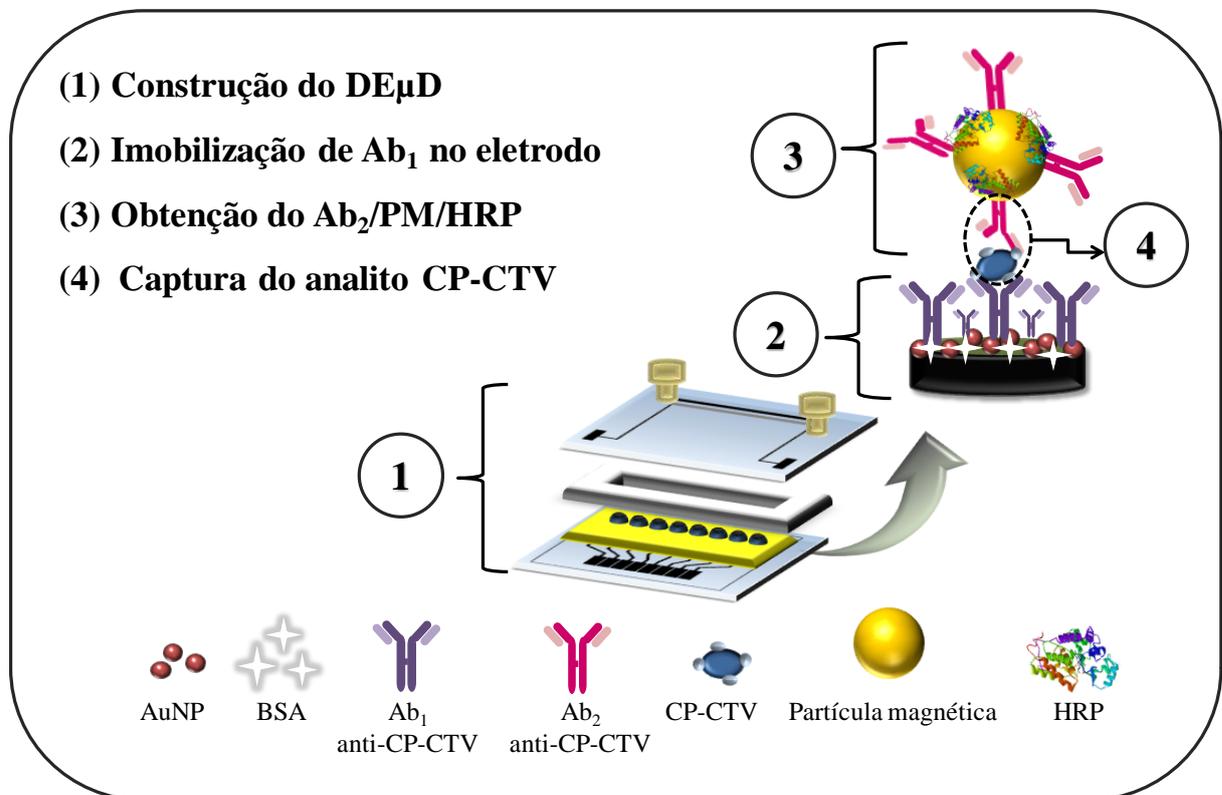


FIGURA 3.1 - Ilustração esquemática das etapas necessárias para o imunoenensaio proposto: (1) construção do dispositivo microfluídico descartável; (2) etapa de modificação da superfície do eletrodo de trabalho com anticorpos monoclonais ( $Ab_1$ ); (3) preparação do imunocombinado contendo partículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais e enzimas HRP; e (4) captura do biomarcador CP-CTV usando o imunocombinado e formação do imunoenensaio do tipo sanduíche.

### 3.2.4.1 - Fabricação do DE $\mu$ D

O dispositivo eletroquímico microfluídico descartável (DE $\mu$ D) foi construído contendo oito eletrodos de trabalho a base de carbono (8-ETs), um eletrodo de pseudo-referência de Ag|AgCl e um contra-eletrodo, conforme descrito na literatura<sup>81,99,100</sup>. Resumidamente, duas folhas de poliéster foram usadas para preparar os eletrodos de carbono serigrafados, na qual uma folha foi usada para os 8-ETs e a outra folha foi usada para os eletrodos de referência e contra-eletrodo. Para isso, máscaras com os modelos dos eletrodos foram construídas em um material polimérico de vinil adesivo usando o programa Silhouette Studio e uma impressora de recorte. A figura 3.2 mostra as etapas da preparação do eletrodo de carbono serigrafado, na qual temos (a) a transferência da máscara negativa para uma folha de poliéster; (b) a deposição da tinta condutora de carbono pelo processo de serigrafia com auxílio de uma espátula de plástico; (c) a cura da tinta a 90 °C em estufa por 30 minutos; (d) a remoção da máscara de vinil e (e) a delimitação da área geométrica dos 8-ETs com uma máscara de vinil contendo 8 orifícios de 2,0 mm cada, seguida por prensagem a quente. Para o eletrodo de referência, duas etapas adicionais foram necessárias: (f) aplicação da tinta de prata/cloreto de prata (Ag|AgCl) e a cura dessa tinta a 60 °C por 30 minutos.

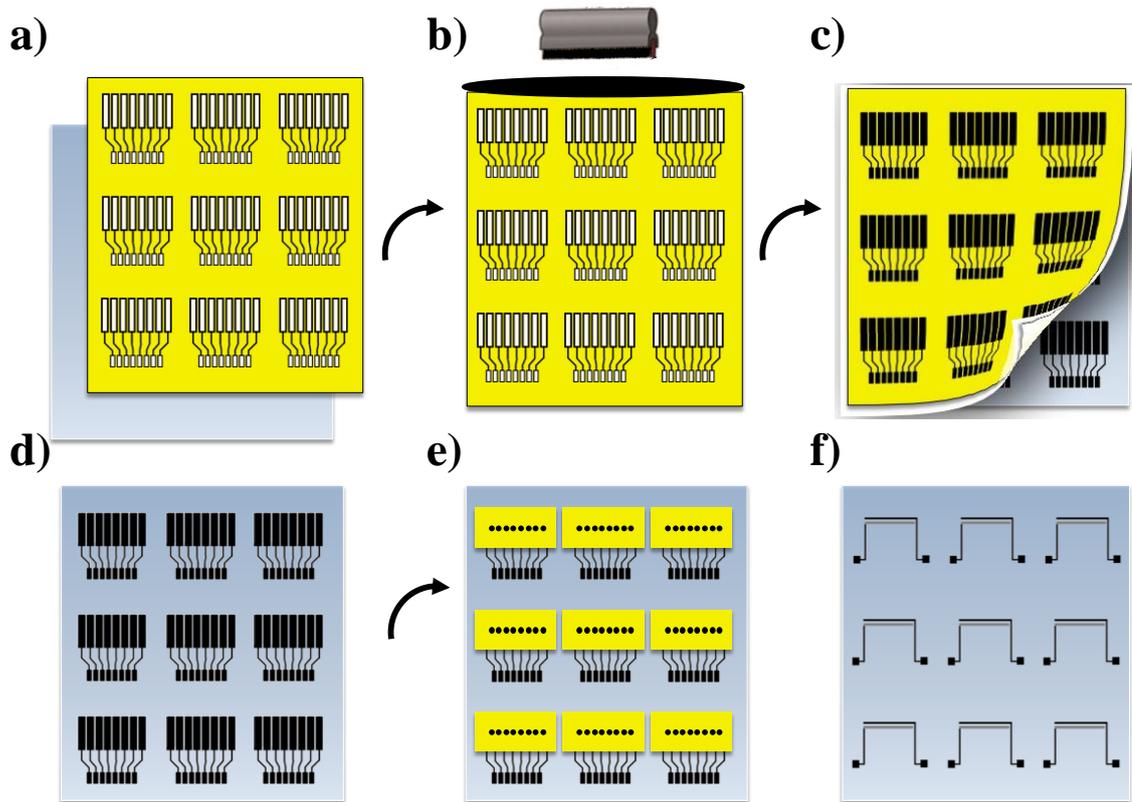


FIGURA 3.2 - Representação esquemática da construção dos eletrodos de carbono serigrafados: (a) transferência da máscara de vinil para a folha de transparência; (b) deposição da tinta condutora de carbono sobre o substrato; (c) remoção do vinil adesivo após cura da tinta; (d) delimitação da área dos eletrodos com uma máscara de vinil contendo 8 orifícios; e (f) obtenção do eletrodo de pseudo-referência após aplicação da tinta de Ag|AgCl.

O dispositivo microfluídico foi montado usando cartão adesivo de poliestireno com dupla face, que foi utilizado para delimitação do canal microfluídico, como representado na figura 3.3. O canal microfluídico, com as dimensões de 4 mm de largura e 440 mm de comprimento totalizando um volume de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ , foi gerado com auxílio de uma impressora de recorte (A3 Cutting Plotter, BR). O cartão adesivo dupla face foi colocado em contato com os eletrodos de referência e auxiliares fabricados na folha de transparência e, em seguida, a segunda folha com 8 eletrodos de trabalho previamente modificados com o  $\text{Ab}_1$  (item 3.2.4.2) foi colocada sobre essa

estrutura, de forma a ensanduichar o cartão dupla face e formar o canal fluídico, mantendo todos os eletrodos alinhados. Orifícios, para entrada e saída da solução, foram realizados no poliéster contendo o eletrodo de referência e contra-eleto-rodo.

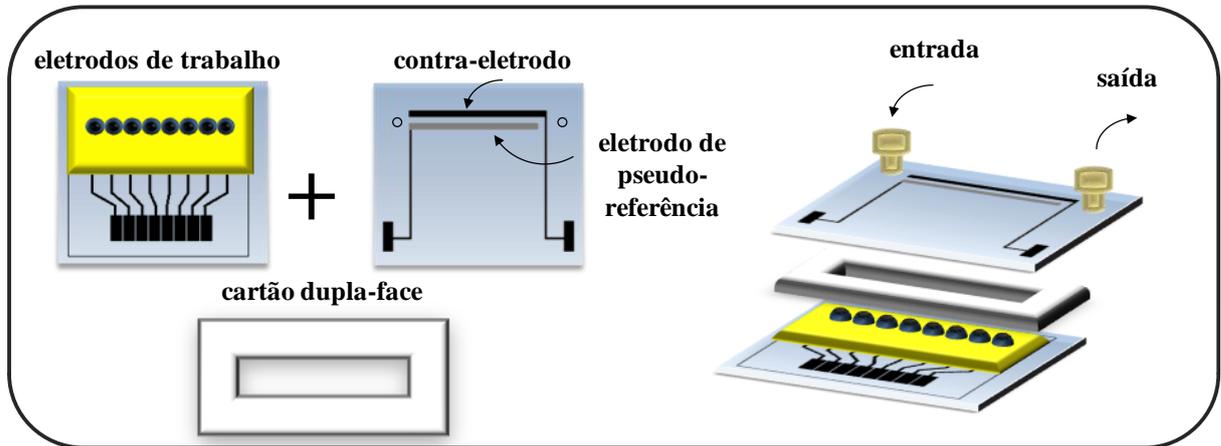


FIGURA 3.3 - Ilustração esquemática da montagem do DEμD usando os substratos com os eletrodos e um cartão adesivo de dupla-face.

### 3.2.4.2 - Imobilização dos anticorpos monoclonais na superfície dos eletrodos

As etapas para imobilização covalente dos anticorpos monoclonais ( $Ab_1$ ), específicos para CP-CTV, na superfície dos 8 eletrodos de trabalho estão detalhadas na Figura 3.4, seguindo procedimentos descritos na literatura<sup>82,98,99</sup>. Inicialmente, 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de PDDA ( $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram colocados na superfície do eletrodo e deixados por 20 minutos para a formação de uma camada carregada positivamente. Após esse tempo, os 8 eletrodos foram lavados e secos com auxílio de gás nitrogênio, em seguida foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  da dispersão de nanopartículas de ouro decoradas com glutathione (AuNPs-GSH) e mantidos por 20 minutos. Detalhes da síntese de AuNPs-GSH encontram-se no item 3.2.3.2. Em seguida, o excesso de AuNPs-GSH foi retirado usando água

ultrapura e seco sob atmosfera de nitrogênio, levando, então, a formação de uma bicamada (PDDA/AuNPs) sobre a superfície do eletrodo. A imobilização covalente do Ab<sub>1</sub> nas AuNPs-GSH foi realizada pela ativação dos grupos carboxilas presentes nas nanopartículas, e para isso, 5 µL de uma solução recém preparada contendo EDC (0,4 mol L<sup>-1</sup>) e NHS (0,1 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados aos eletrodos previamente modificados. Após 10 minutos, os eletrodos foram lavados com água, e 5 µL de solução Ab<sub>1</sub> (10 µmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados à superfície do eletrodo e mantidos por 18 horas para garantir uma imobilização completa dos anticorpos na superfície dos 8-ETs. Esta superfície foi então lavada com PBS (pH 7,4) e incubada por uma hora com 5 µL de BSA (2% m/m em PBS), a fim de bloquear todos os grupos carboxilas ativados que não reagiram. Por fim, os eletrodos foram novamente lavados com PBS (pH 7,4) e armazenados sob refrigeração até sua utilização.

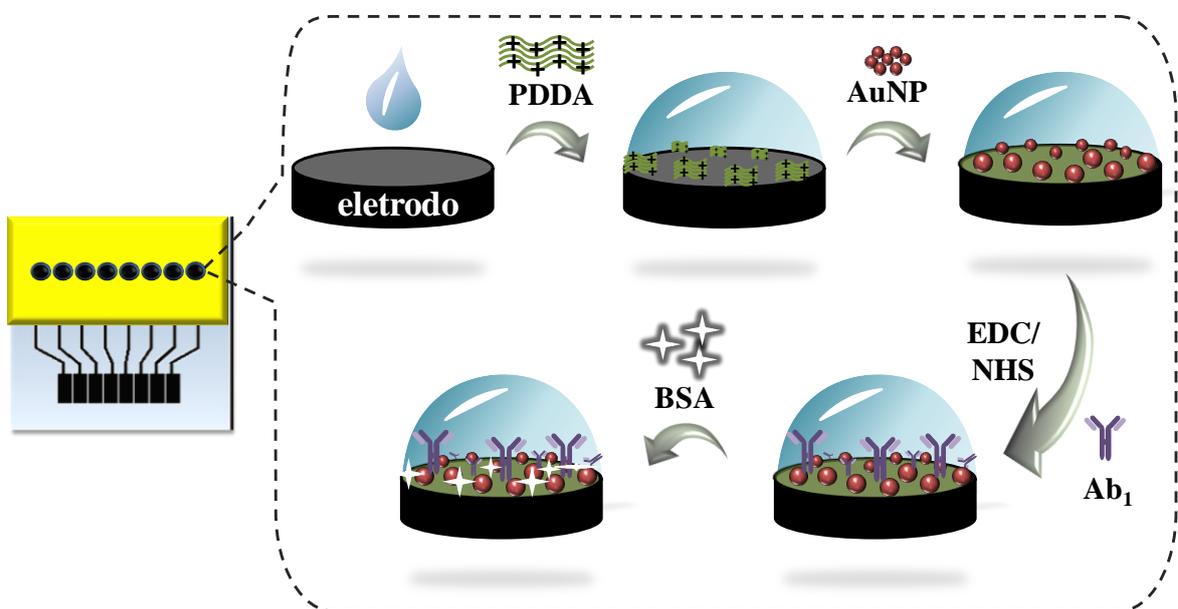


FIGURA 3.4 - Esquema com as etapas envolvidas na imobilização covalente dos anticorpos monoclonais anti-CP-CTV sobre os eletrodos de carbono.

### *3.2.4.3 - Imobilização do anticorpo policlonal e da enzima HRP na superfície da partícula magnética*

A enzima HRP e o anticorpo policlonal de captura foram conjugados às partículas magnéticas seguindo trabalhos relatados na literatura<sup>82,98,99,101</sup>, e as etapas estão esquematicamente ilustradas na figura 3.5. Para isto, as PMs, adquiridas comercialmente com concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> e diâmetro médio de 1,0 µm, foram agitadas em vórtex e, em seguida, uma alíquota de 200 µL foi transferida para um microtubo de 2,0 mL e lavadas com tampão MES (50 mmol L<sup>-1</sup>), pH 5,2. Para as etapas de lavagem, a dispersão foi mantida por um minuto em um suporte magnético e, após completa separação, o sobrenadante foi descartado. Logo após, 300 µL de uma solução recém-preparada de EDC/NHS (3 mg mL<sup>-1</sup> preparado em MES) foram adicionados ao tubo e este foi mantido por 30 minutos sob agitação lenta (6 RPM). Esta etapa foi realizada para ativar os grupos carboxilas presentes na superfície das PMs. Em seguida, etapas de lavagens com MES foram realizadas e o sobrenadante foi descartado. O próximo passo foi a adição de 250 µL de solução com anticorpo policlonal anti-CP-CTV (Ab<sub>2</sub>, 10 µg mL<sup>-1</sup>) na dispersão das partículas magnéticas, que foram mantidas sob agitação lenta por 24 horas, à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi removido após separação magnética, seguida pelo descarte do sobrenadante, e as etapas de lavagem foram realizadas utilizando uma solução tampão PBS com 0,1% de BSA m/v (pH 7,4). Posteriormente, 500 µL da solução de HRP (1,2 mg mL<sup>-1</sup> diluídos em PBS) foram adicionados à dispersão de Ab<sub>2</sub>/PMs e agitados lentamente por 18 horas à temperatura ambiente. O excesso de enzima HRP que não conjugaram também foi descartado, e as partículas foram lavadas usando tampão PBS com 0,1% (m/v) BSA e 0,05% (m/v) de Tween 20 (PBS-TW). Para bloquear os grupos carboxilas ativos que não reagiram, 500 µL de uma solução de glicina (1,0 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados ao bioconjugado e mantidos por 30 minutos sob

agitação lenta. Por fim, o bioconjugado  $Ab_2/PM/HRP$  foi lavado com PBS, ressuspensão em 400  $\mu$ L de solução de PBS-TW e mantido refrigerado a 4 °C até seu uso.

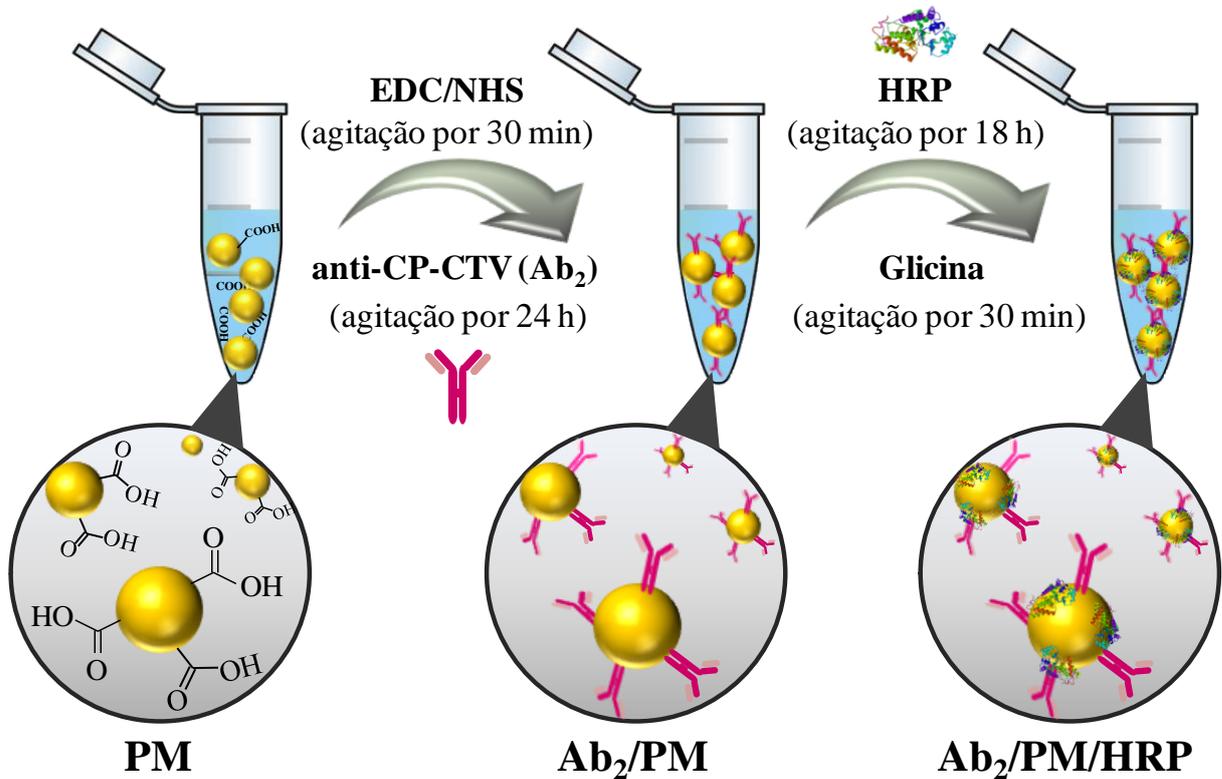


FIGURA 3.5 - Representação das etapas de imobilização das partículas magnéticas carboxiladas com os anticorpos policlonais e enzima HRP após a ativação com EDC/NHS.

#### 3.2.4.4 - Estudo da resposta eletroquímica do $DE\mu D$ e construção da curva de calibração para CP-CTV

Para avaliar a resposta eletroquímica dos eletrodos modificados, o  $DE\mu D$  foi inicialmente conectado ao sistema de análise. Esse sistema foi composto por uma bomba de seringa para propulsão da solução transportadora (PBS-TW), conectada a uma válvula de injeção cromatográfica, onde foi injetada a amostra ou a solução de detecção, e finalmente acoplada ao sistema de

detecção DE $\mu$ D. Tubos e conectores de poliéter-éter-cetona (PEEK) foram utilizados para estas conexões.

Após a montagem do sistema microfluídico, a captura imunomagnética do biomarcador CP-CTV foi realizada a partir da solução padrão/amostra diluída em PBS e o bioconjugado adicionado a esta solução<sup>99</sup>, conforme ilustrado na figura 3.6. Para isso, o Ab<sub>2</sub>/PM/HRP foi adicionado às soluções padrão de CP-CTV, diluídas em solução tampão PBS (pH 7,4). Neste caso, um volume de 500  $\mu$ L de solução padrão e 20  $\mu$ L de bioconjugado foram adicionados a um microtubo de 2,0 mL e mantidos sob agitação lenta para incubação (37 °C) por 30 minutos. Após esse tempo, a dispersão foi lavada com PBS-TW, auxiliada pelo uso do suporte magnético.

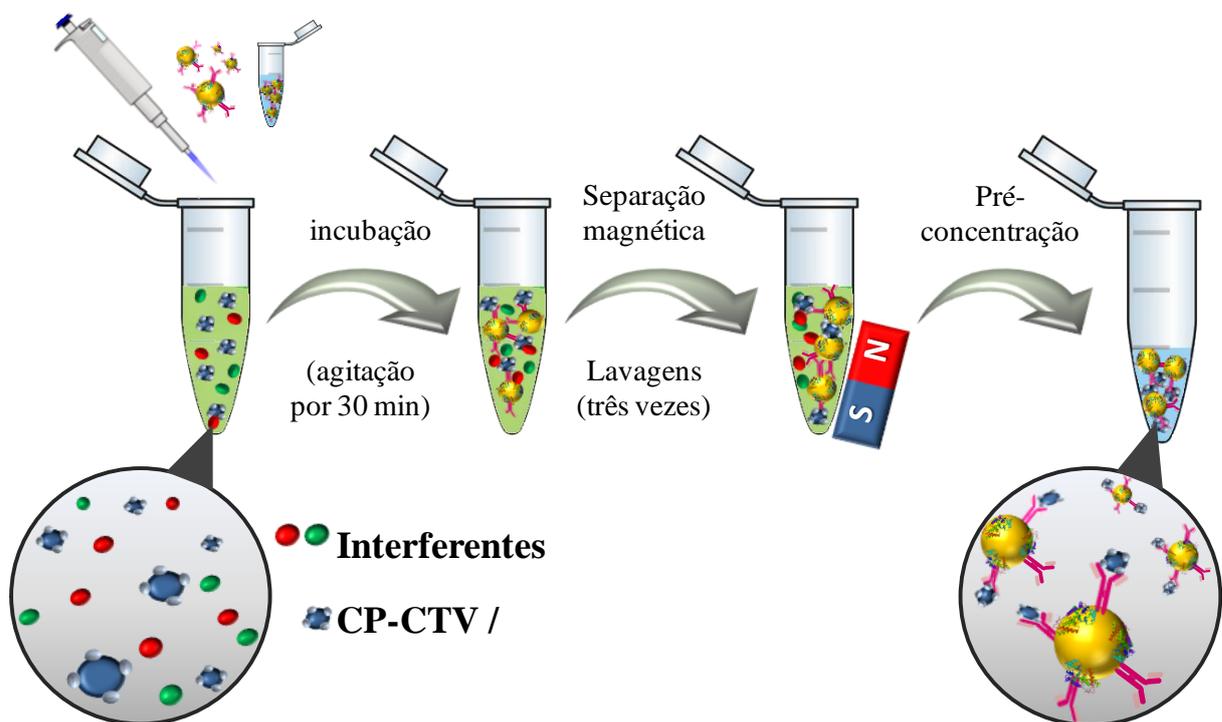


FIGURA 3.6 - Diagrama esquemático da etapa de captura do biomarcador CP-CTV após a adição de Ab<sub>2</sub>/PM/HRP à solução da amostra, seguida das etapas de incubação, separação magnética e lavagens com tampão PBS.

Posteriormente, o biomarcador imunocapturado (CP-CTV/Ab<sub>2</sub>/PM/HRP) foi ressuspensão em 125  $\mu$ L de PBS-TW e injetado ao

sistema microfluídico através da válvula de injeção. Nesse caso, uma alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$  foi preenchida com a suspensão CP-CTV/Ab<sub>2</sub>/PM/HRP, que posteriormente foi carregada em direção ao sistema de detecção (DE $\mu$ D). Após observar o preenchimento do canal microfluídico com a suspensão, o fluxo foi interrompido e mantido por 30 minutos para formação do imunoenensaio do tipo sanduíche. Logo após, a bomba de seringa foi acionada novamente e o DE $\mu$ D foi lavado por 2 minutos com a solução transportadora (PBS-TW), e desta forma, o bioconjugado não-ligado foi eliminado. Depois disso, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução mista contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de hidroquinona e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio foram injetados no DE $\mu$ D pela válvula de injeção. Um potencial fixo de -0,2 V vs Ag|AgCl foi aplicado simultaneamente aos 8 imunossensores, resultando em sinais transientes de corrente, no qual o valor de corrente foi utilizado como parâmetro analítico<sup>82,99</sup>.

### **3.2.5 - Preparação das amostras de plantas para análise via imunoenensaio desenvolvido**

A detecção da CP-CTV em amostras de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) não-infectadas e infectadas foi realizada a fim de avaliar o desempenho do método microfluídico desenvolvido. As amostras foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, São Paulo, BR). Para o diagnóstico do CTV utilizando o DE $\mu$ D, 1,0 g das folhas foram moídas com auxílio de almofariz com pistilo e suspensas em 6,0 mL de tampão tri(hidroximetil) aminometano (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4)<sup>59</sup>. Esta suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até sua utilização. O extrato das folhas foi diluído em tampão PBS, e uma alíquota desta solução foi avaliada pelo imunossensor desenvolvido. Os resultados foram comparados aos obtidos com o kit ELISA adquirido da Rheabiotech (São Paulo, BR).

### 3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 - Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos construídos

A presença de grupo carboxila na superfície do eletrodo é de grande importância para a imobilização covalente dos anticorpos monoclonais. Para isso, nanopartículas de ouro decoradas com glutatona foram usadas para fornecer esse grupo funcional à superfície do eletrodo, além de proporcionar grande área superficial. Assim, as etapas envolvidas na preparação do imunossensor foram caracterizadas morfológicamente e eletroquimicamente. Para a caracterização morfológica, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do eletrodo sem modificação e modificado com AuNPs-GSH foram realizadas e são apresentadas na figura 3.7.

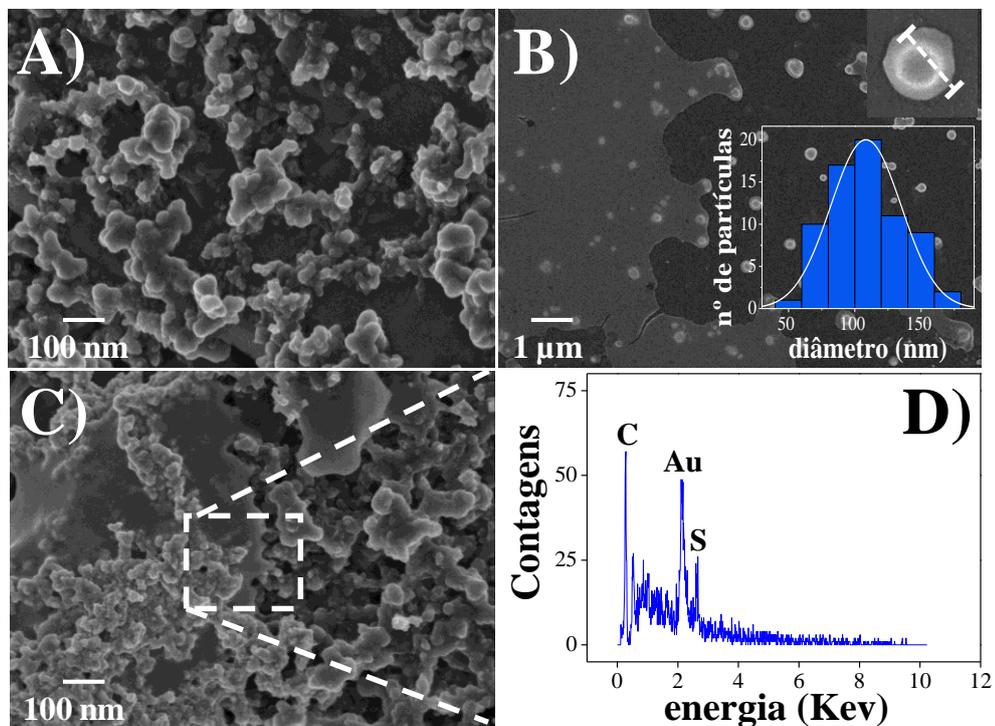


FIGURA 3.7 - Imagens de MEV obtidas para A) a superfície do eletrodo sem modificação, B) para as AuNP-GSH com seu histograma da distribuição do

tamanho (inserção) e C) AuNPs-GSH na superfície do eletrodo com D) confirmação de sua composição química por EDX.

Inicialmente, foi obtida a imagem de MEV da tinta condutora de carbono usada na construção dos eletrodos serigrafados (figura 3.7 A). O eletrodo apresentou uma superfície com rugosidade composta por agregados de partículas de carbono de diferentes tamanhos e com forma indefinida. Na figura 3.7 B, as AuNPs-GSH foram caracterizadas separadamente adicionando uma alíquota da dispersão de nanopartículas em uma placa de carbono vítreo (1,0 cm × 1,0 cm), que foi seca à temperatura ambiente. Nesta imagem do MEV, as nanopartículas apresentaram aparência esférica e morfologia homogênea. Os diâmetros dessas partículas foram medidos usando o software *ImageJ*, e o valor médio de  $110 \pm 20$  nm foi obtido, como demonstrado na inserção da figura 3.7 B. Já a imagem de MEV para o PDDA/AuNPs-GSH depositado sobre a superfície do eletrodo de carbono é mostrada na figura 3.7 C. Conforme pode ser observado, após a deposição da bicamada ocorreu a formação de um filme, no qual sua composição foi confirmada pela análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) (figura 3.7 D), que revelou a presença de enxofre, devido ao grupo glutathiona, e ouro, devido às AuNPs, indicando efetiva modificação da superfície do eletrodo com as nanopartículas.

Para caracterização eletroquímica, os eletrodos de carbono sem modificação, modificados com PDDA (C/PDDA) e com AuNPs (C/PDDA/AuNP) foram avaliados pela técnica de voltametria cíclica utilizando ácido ferroceno monocarboxílico como sonda ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl), como mostra a figura 3.8 A. O estudo foi realizado usando o DE $\mu$ D, com injeção da solução de sonda redox no sistema microfluídico usando a bomba de seringa. Após o preenchimento do canal microfluídico, o fluxo foi interrompido e a CV foi realizada variando o potencial de 0 a 0,6 V vs. Ag|AgCl, e  $50 \text{ mV s}^{-1}$

de velocidade de varredura. Como mostra a figura 3.8 A, um pequeno aumento na corrente de pico de oxidação foi observado após a modificação do eletrodo com PDDA (curva c). Esse efeito era esperado, uma vez que o polímero catiônico foi usado apenas para formar o filme sobre o carbono carregado negativamente presente na superfície do eletrodo. Depois disso, as AuNPs-GSH com carga negativa foram adicionadas e interagiram eletrostaticamente com o PDDA, previamente depositado no eletrodo. Após essa modificação, foi observado um aumento na corrente de pico de oxidação (curva d), que pode estar relacionado à alta condutividade e ao aumento da área superficial, adquirida com a deposição das AuNPs. Esses resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente por MEV, que confirmaram a eficiência do procedimento de modificação do eletrodo. As AuNPs também conferem aos eletrodos excelente biocompatibilidade para incorporar biomoléculas<sup>102,103</sup>.

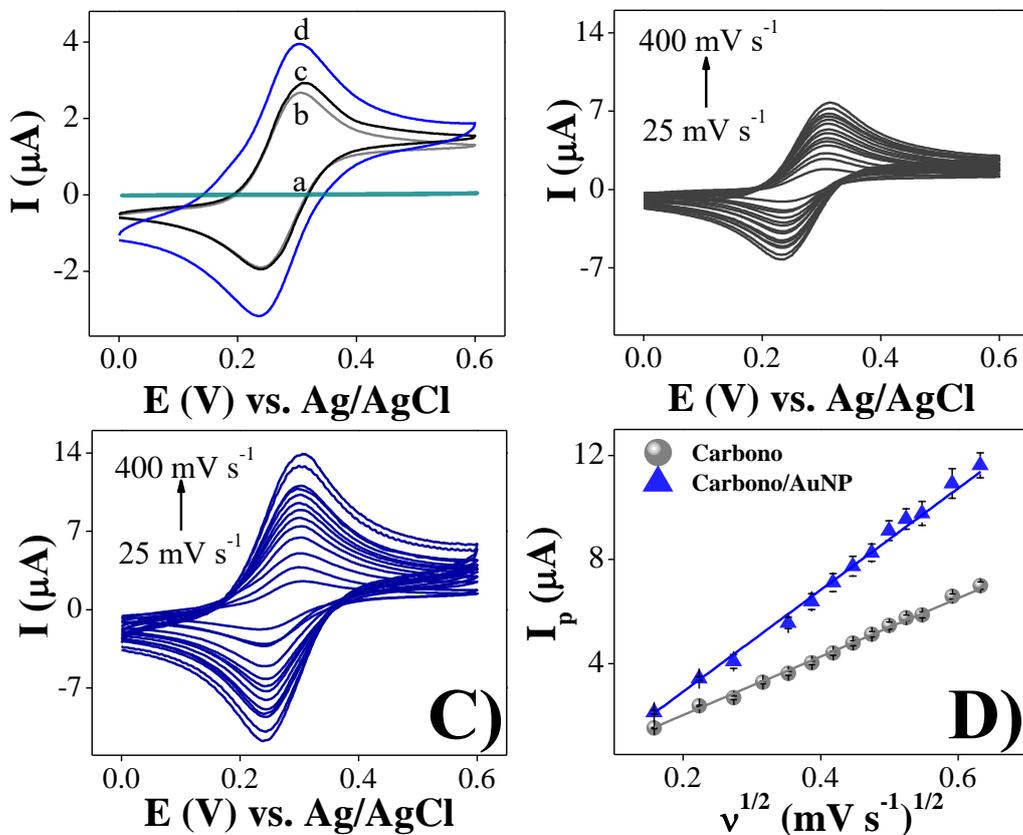


FIGURA 3.8 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos de carbono (a) sem modificação em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, e (b) sem modificação,

(c) modificado com PDDA e com (d) PDDA/AuNP em  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ferroceno monocarboxílico contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Estudo de diferentes velocidades de varredura ( $25 - 400 \text{ mV s}^{-1}$ ) para eletrodo de carbono B) sem modificação e C) modificado com PDDA/AuNP. D) Correlação linear entre a corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para os eletrodos de carbono correspondentes às figuras B e C.

Além disso, a área aparente da superfície eletroquimicamente ativa dos eletrodos sem modificação e com PDDA/AuNP também foi avaliada. A técnica de voltametria cíclica foi realizada na faixa de potencial de 0 a  $0,6 \text{ V}$  vs. Ag|AgCl, variando a velocidade de varredura de 25 a  $400 \text{ mV s}^{-1}$  (figura 3.8 B e C). Os voltamogramas mostraram um comportamento reversível para a sonda redox, apresentando a razão da corrente de pico anódico e catódico igual a 1 e independente da velocidade de varredura. A figura 3.8 D também apresentou uma dependência linear entre a corrente de pico anódico ( $I_p$ ) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) para os eletrodos de carbono sem modificação e modificado com PDDA/AuNPs, garantindo que o sistema segue a equação de Randles-Sevcik, cujos valores são dados pela equação abaixo<sup>104,105</sup>.

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

Sendo que  $n$  é o número de elétrons ( $n = 1$ ),  $C$  é a concentração da espécie em solução ( $C = 1,0 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão da sonda eletroquímica em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl ( $D = 3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $A$  é a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ )<sup>104</sup>. A área eletroativa aparente para os eletrodos de carbono sem e com AuNPs foi estimada e comparada com a área geométrica da superfície do eletrodo ( $3,14 \text{ mm}^2$ ). O eletrodo de carbono sem modificação apresentou uma área eletroativa de  $2,49 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ , consideravelmente menor que a sua área geométrica.

Possivelmente esse efeito está relacionado à presença de polímeros isolantes na tinta de carbono. Como esperado, a área eletroativa aparente no eletrodo modificado com AuNPs aumentou significativamente quando comparada ao eletrodo de carbono sem modificação, apresentando um valor médio de  $4,46 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ . Os desvios padrão relativos (DPR) obtidos para os eletrodos sem e com modificação (PDDA/AuNP) foram de 2,3% e 4,6%, respectivamente, indicando boa repetitividade dos eletrodos descartáveis desenvolvidos.

### **3.3.2 - Caracterização do bioconjugado Ab<sub>2</sub>/PM/HRP por UV-Vis**

O procedimento do imunoenensaio proposto neste trabalho exigiu a modificação das partículas magnéticas com anticorpos, visando à captura e separação de biomarcadores presentes nas amostras, e com HRP, que foi utilizada como marcador eletroquímico para obtenção do sinal analítico. As etapas para preparar o bioconjugado Ab<sub>2</sub>/MB/HRP foram avaliadas por espectrofotometria UV-Vis. Assim, foram levantados espectros de absorção para as suspensões contendo PM, Ab<sub>2</sub>/PM e Ab<sub>2</sub>/PM/HRP, e comparados com os espectros para as soluções de anticorpos e HRP livres. Vale ressaltar que neste estudo, o protocolo de modificação das PMs seguiu o item 3.2.4.3, excluindo a etapa de bloqueio com BSA e glicina, tendo em vista detectar somente as bandas que surgem devido à presença de Ab<sub>2</sub> e HRP. Para as análises as soluções e suspensões foram preparadas em PBS (pH 7,4) na proporção de 1:150 (v/v), respectivamente.

Na figura 3.9 são apresentados os espectros de absorção do anticorpo anti-CP-CTV, HRP, PMs e do bioconjugado. Uma intensa banda de absorção em 270 nm pode ser observada nos espectros das soluções contendo Ab<sub>2</sub> e HRP (figura 3.9 A), que pode ser atribuída aos grupos amina presentes tanto nos anticorpos quanto na HRP. Após a bioconjugação das PMs com anticorpos, observa-se o aparecimento desta banda em 270 nm (figura 3.9 B),

bem como seu incremento quando a HRP foi adicionada ao  $Ab_2/PM$ , formando o  $Ab_2/PM/HRP$ . Além disso, as inserções das figuras 3.9 A e B apresentam uma banda de absorção fraca próxima a 430 nm, que pode ser atribuída a estruturas presentes na HRP. Essas bandas de absorção sugerem uma ligação covalente bem-sucedida do  $Ab_2$  e HRP nas PMs, o que está de acordo com outros estudos relatados na literatura<sup>106–108</sup>.

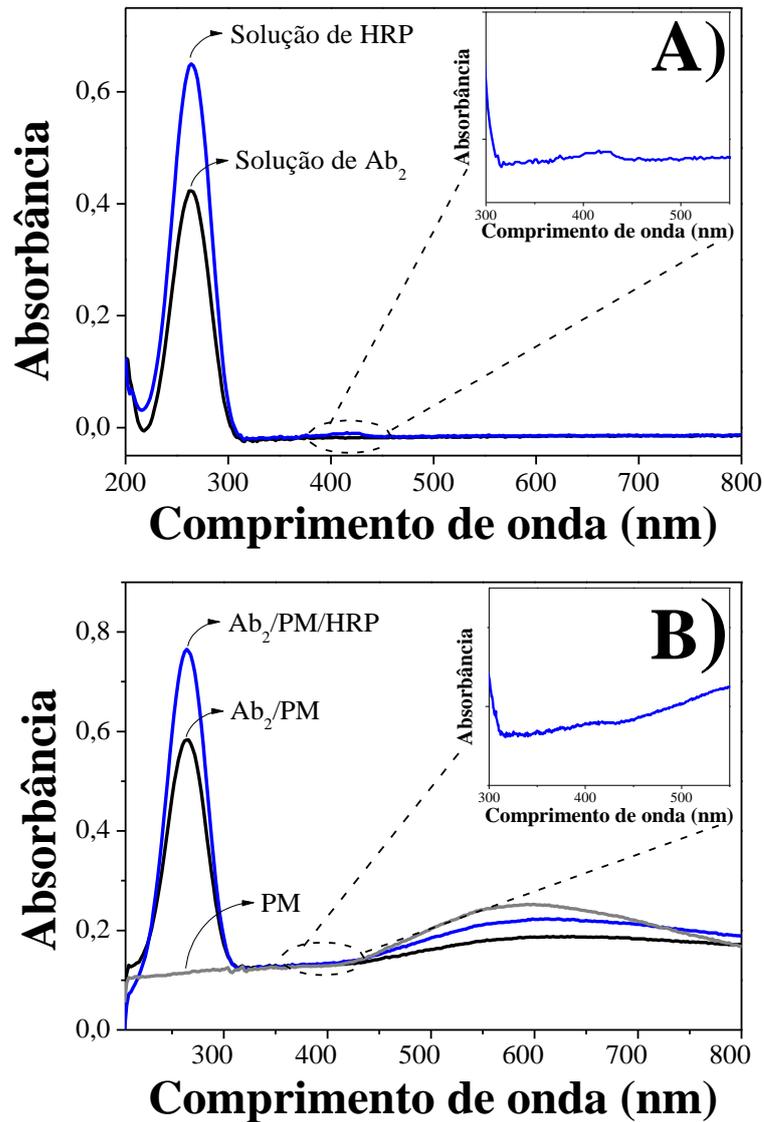


FIGURA 3.9 - Espectros de absorção UV-Vis da A) solução contendo anticorpo  $Ab_2$  e enzima HRP e B) da suspensão contendo PM,  $Ab_2/PM$  e  $Ab_2/PM/HRP$ .

### 3.3.3 - Otimização das condições experimentais

Após a caracterização do sistema, alguns parâmetros foram avaliados a partir dos sinais obtidos pelo imunoenensaio desenvolvido para a detecção de CP-CTV. A detecção eletroquímica da proteína CP-CTV foi indiretamente realizada pela atividade enzimática da HRP, utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como substrato e hidroquinona ( $\text{H}_2\text{Q}$ ) como mediador. A mistura foi injetada no canal microfluídico do DE $\mu$ D e foi obtida uma resposta de corrente catódica transiente. Na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{Q}$ , o mecanismo de reação da detecção de CP-CTV pode ser resumido de acordo com a figura 3.10<sup>109-111</sup>.

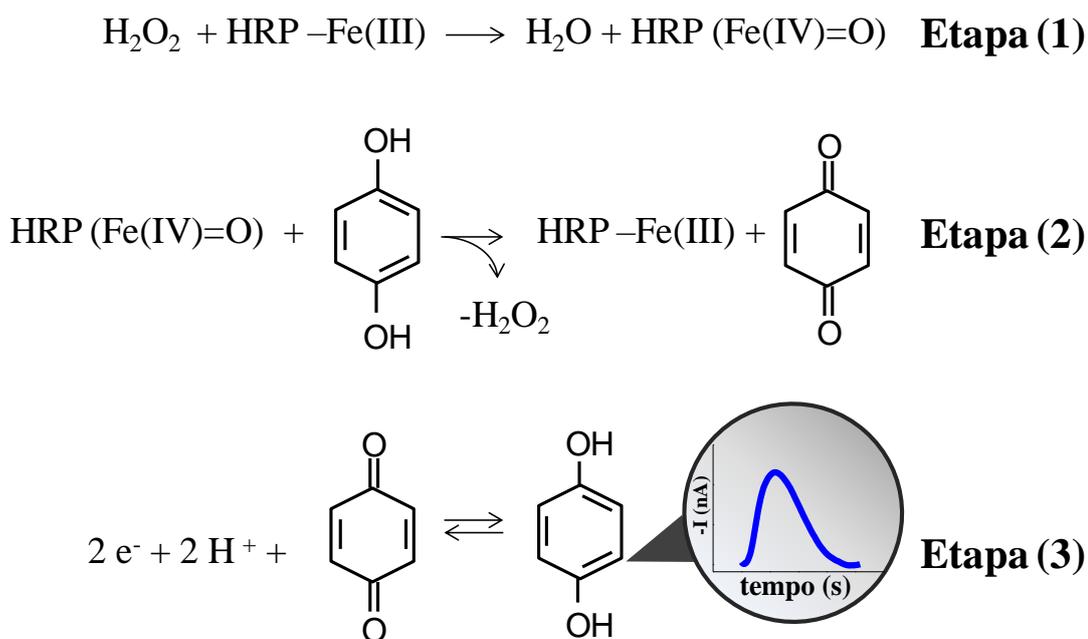


FIGURA 3.10 - Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP com seu substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroquinona como mediador eletroquímico, evidenciando a resposta eletroquímica do produto formado.

A etapa (1) representa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela HRP ligada às PMs, formando um complexo oxo-HRP-Fe(IV)=O. Em seguida, o complexo oxo foi regenerado na presença de  $\text{H}_2\text{Q}$ , formando a benzoquinona (Q) na reação

química representada na etapa 2. Finalmente, a Q foi eletroquimicamente reduzida no eletrodo, aplicando o potencial de  $-0,2$  V (etapa 3), que originou um ciclo catalítico, com a  $H_2Q$  eletrogerada reagindo novamente com o complexo oxo gerado (etapa 2) e assim por diante.

No procedimento desenvolvido, o tempo de incubação para a captura imunomagnética e o tempo para a formação do sanduíche nos imunossensores são parâmetros críticos para a realização do imunoensaio, por isso foram extensivamente avaliados. O tempo de incubação foi avaliado por meio da adição de  $10 \text{ pg mL}^{-1}$  de CP-CTV na dispersão do bioconjugado  $Ab_2/PM/HRP$  contido em um microtubo, que foi mantido sob agitação lenta à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  entre intervalos de tempo de 10 e 60 minutos. Em seguida, o bioconjugado formado (CP-CVT/ $Ab_2/PM/HRP$ ) foi lavado usando o suporte magnético, ressuspenso em PBS-TW e injetado no DE $\mu$ D, para formação de imunoensaio do tipo sanduíche na superfície do eletrodo. Após aplicação do potencial fixo de  $-0,2$  V vs Ag|AgCl e adição de  $100 \mu\text{L}$  da solução de detecção ( $H_2O_2/H_2Q$ ), foi obtida a resposta da corrente transitória referente a redução da benzoquinona. A resposta analítica da dependência da corrente de pico catódico ( $I_p$ ) em relação ao aumento do tempo de incubação para a imunorreação da CP-CTV e  $Ab_2/PM/HRP$  é apresentada na figura 3.11 A. Pode-se observar que a  $I_p$  aumentou com maiores tempos de incubação, atingindo seu valor máximo aos 30 minutos. Para tempos superiores, observou-se uma pequena diminuição na corrente, no qual o valor da  $I_p$  permaneceu constante em períodos mais longos, devido à saturação no complexo antígeno-anticorpo. Portanto, o tempo de incubação de 30 minutos foi escolhido como o tempo ideal.

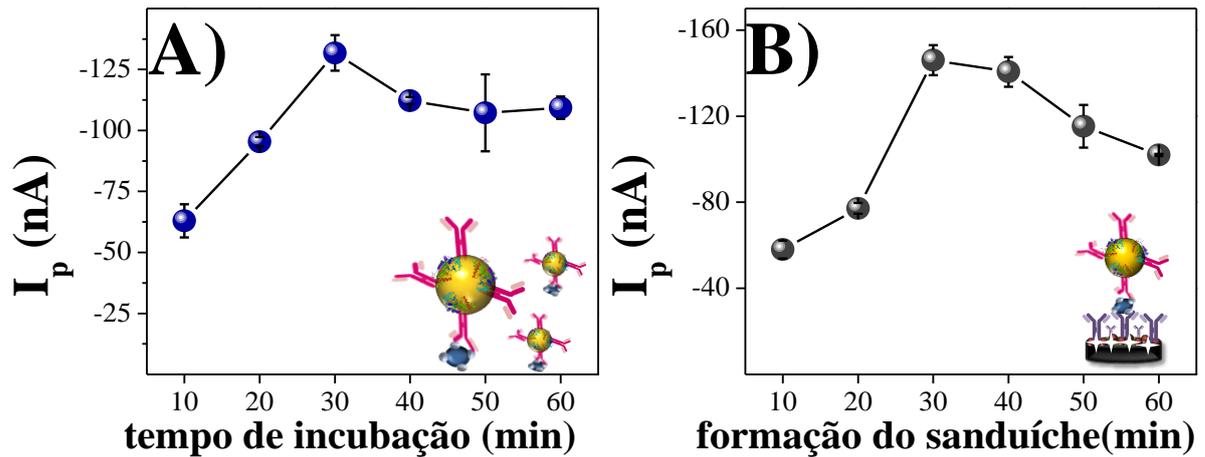


FIGURA 3.11 - A) Estudo do tempo de interação dos anticorpos policlonais com a proteína CP-CTV e B) influência do tempo de formação do sanduíche no dispositivo microfluídico; sob condições:  $[CP-CTV] = 19,5 \text{ fg mL}^{-1}$ ,  $[Ab_1] = 10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $[Ab_2] = 10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O tempo de formação do imuno-sanduíche entre o CP-CTV/ $Ab_2$ /PM/HRP e o  $Ab_1$  presente na superfície do eletrodo foi avaliado entre 10 e 60 minutos. A influência deste tempo na intensidade da corrente é mostrada na figura 3.11 B, no qual um maior sinal analítico foi observado para o tempo de interação de 30 minutos. Semelhante ao estudo anterior, tempos mais longos ocasionaram uma diminuição da  $I_p$ , que pode estar relacionada a uma inativação parcial dos anticorpos, diminuindo a resposta analítica global do imunossensor.

### 3.3.4 - Curva de calibração para CP-CTV usando o imunoenensaio desenvolvido

O imunoenensaio otimizado foi aplicado para construir a curva de calibração para CP-CTV. As etapas de captura, separação e pré-concentração para detecção de CP-CTV foram realizadas em soluções padrão compostas pelo biomarcador diluído em diferentes concentrações em PBS (pH 7,4). As respostas

transientes de corrente, proporcionais às concentrações do biomarcador, são apresentadas na figura 3.12 A.

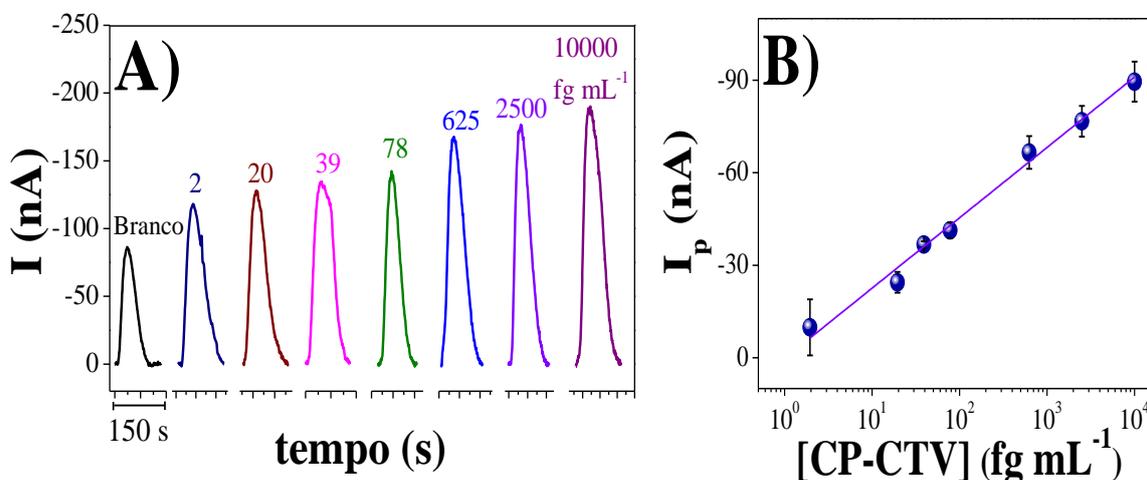


FIGURA 3.12 - A) Sinais transientes de corrente obtidos para soluções padrão de CP-CTV em PBS (pH 7,4) a  $-0,2$  V vs. pseudo referência (Ag|AgCl) e solução de detecção de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}/\text{H}_2\text{O}_2$  e B) curva analítica para CP-CTV ( $I$  (nA) x  $\log$  [CP-CTV]).

A relação linear entre a resposta da corrente catódica e a concentração de CP-CTV é mostrada na figura 3.12 B. Como pode ser observado, o imunoenensaio desenvolvido apresentou boa resposta linear para o biomarcador CP-CTV em uma ampla faixa de concentração, variando de  $2,0 \text{ fg mL}^{-1}$  a  $10 \text{ pg mL}^{-1}$ . Neste caso, a equação da reta obtida foi  $I_p \text{ (nA)} = 341,9 + 22,8 \log [\text{CP-CTV}]$  com coeficiente de correlação linear calculado de 0,981 e limite de detecção (LD) de  $0,3 \text{ fg mL}^{-1}$ . O LD foi calculado segundo método IUPAC, de acordo com o critério  $(3s)/b$ , onde  $s$  é o desvio padrão do branco ( $n = 10$ ) e  $b$  é a inclinação da curva de calibração. Ressaltamos ainda que este LD é o menor valor reportado na literatura para a detecção de CP-CTV até o momento, como mostra a Tabela 3.1.

TABELA 0.1 - Comparação dos imunoenaios para detecção de CP-CTV.

<b>Método de detecção</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Faixa linear (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ref.</b>
FRET	AuNPs-CP-CTV/QDs-Ab	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>	130	58
fluorimétrico	QD-Ab/CNPs-QD	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>	220	60
FRET	Ab-QD/CP-CTV-Rd	–	198	61
Eletroquímico	Au-Ab/CP-CTV	3 – 1,5 × 10 <sup>3</sup>	8,0	59
Eletroquímico	DE $\mu$ D/Ab <sub>1</sub> /CP-CTV/Ab <sub>2</sub> /PM/HRP	2,0 × 10 <sup>-6</sup> – 10 × 10 <sup>-2</sup>	3 × 10 <sup>-7</sup>	<b>Este trabalho</b>

FRET- transferência de energia de ressonância por fluorescência; AuNPs- nanopartículas de ouro; CNPs- nanopartículas de carbono; QDs- quantum dots; CP- proteína do capsídeo; Ab- anticorpo; Ab<sub>1</sub>- anticorpo monoclonal; Ab<sub>2</sub>- anticorpo policlonal; PM- partícula magnética; DE $\mu$ D- dispositivo eletroquímico microfluídico descartável.

Esse baixíssimo limite de detecção pode ser atribuído ao uso das PMs decoradas com anti-CP-CTV e HRP, que permitiu a captura, separação e pré-concentração do analito, além de contribuir na amplificação do sinal eletroquímico. Outra razão pode ser o efeito sinérgico causado pelas AuNPs, presentes na superfície do eletrodo, que se tornaram responsáveis não apenas pela alta seletividade e capacidade de ligação do anticorpo, mas também foi responsável pela alta resposta eletroquímica na redução da benzoquinona, que foi gerada enzimaticamente a partir do marcador HRP. O uso de PMs, além de permitir a obtenção de baixos limites de detecção ao imunoenasão, também é importante para diminuir o efeito de matriz, que são contornados após a etapa de captura. Portanto, o presente procedimento desenvolvido por imunoenasão-

magnético provou ser uma ferramenta promissora para a quantificação de CP-CTV.

### **3.3.5 - Estudo da precisão, repetitividade, estabilidade e potenciais interferentes do imunossensor**

A precisão do imunoenensaio foi avaliada utilizando solução padrão de CP-CTV  $19,5 \text{ fg mL}^{-1}$  e aplicando o método em condições otimizadas. Para isso, foram avaliados os sinais transientes obtidos pelos 8 eletrodos de trabalho de um mesmo dispositivo (intraensaio) e também as respostas de três dispositivos diferentes (interensaio). O procedimento proposto apresentou boa repetitividade, com desvio padrão relativo de 6,7% ( $n = 6$ ) e 7,2% ( $n = 3$ ) para intra e interensaios, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade do imunoenensaio desenvolvido, que envolvem as etapas de construção do DE $\mu$ D, a modificação química dos eletrodos e as etapas de imobilização necessárias para Ab<sub>1</sub>, Ab<sub>2</sub> e HRP, tanto nos eletrodos quanto nas partículas magnéticas.

A estabilidade dos imunossensores nos DE $\mu$ Ds também foi avaliada (figura 3.13 A). Para isso, diferentes dispositivos foram preparados no mesmo dia e armazenados em PBS a 4 °C, e em seguida, os DE $\mu$ Ds foram testados em dias diferentes para a detecção CP-CTV em solução padrão em concentração de  $19,5 \text{ fg mL}^{-1}$ . Os dispositivos, após sete dias de armazenamento nessas condições, apresentaram uma diminuição de 3,2% nas respostas transientes de corrente. Por períodos mais longos de armazenamento (dez dias), a estabilidade do imunossensor foi reduzida, mantendo cerca de 85,0% do desempenho analítico inicial. Estes resultados sugerem que a imobilização e a estabilidade das moléculas de anticorpo na superfície do eletrodo foram bem-sucedidas, demonstrando a preservação da atividade dessa proteína por uma semana, quando mantida a 4 °C em PBS. É importante ressaltar que períodos mais longos

de estabilidade podem ser alcançados para os imunossensores quando mantidos seco.

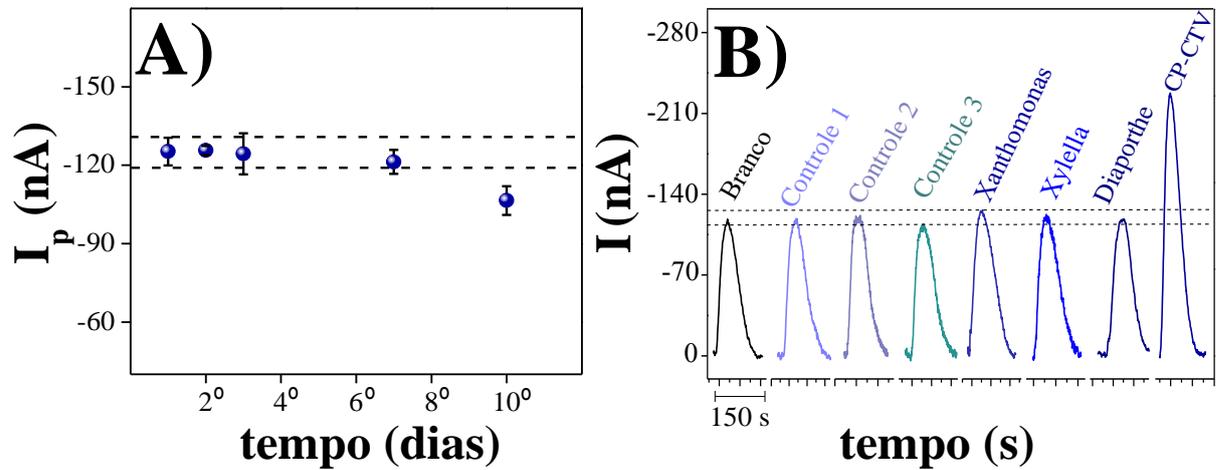


FIGURA 3.13 - A) Avaliação da estabilidade do dispositivo após diferentes tempos de armazenamento usando solução  $19,5 \text{ fg mL}^{-1}$  de CP-CTV em PBS (pH 7,4). B) Especificidade do imunossensor eletroquímico para tampão PBS 7,4 (branco), plantas não infectadas com CTV (amostras controle) e soluções de patógenos de citros: *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* e *Guignardia citricarpa*. Os sinais eletroquímicos foram medidos com a injeção de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{Q}$ .

O imunoenensaio desenvolvido também foi avaliado para outros patógenos de plantas cítricas como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xylella fastidiosa* e *Guignardia citricarpa* a fim de verificar potenciais interferentes (figura 3.13 B). As respostas individuais para cada um dos fitopatógenos foram avaliadas e comparadas com as amostras do branco (somente PBS), de plantas saudáveis (controles) e CP-CTV padrão ( $10,0 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Como esperado, as respostas de sinais transientes de correntes obtidas para os patógenos de *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* e *Guignardia citricarpa* apresentaram magnitudes similares as obtidas com solução do branco, não havendo interferência na detecção de CP-CTV. Também pode ser observado na

figura 3.13 B, as correntes obtidas para amostras de plantas saudas, utilizadas como controle, também apresentaram valores próximos ao branco. Os resultados obtidos indicam a boa seletividade do DE $\mu$ D para o diagnóstico da doença Tristeza dos citros.

### **3.3.6 - Aplicação do imunoensaio em amostras de citros infectadas com CTV**

A aplicabilidade do imunoensaio para o diagnóstico da doença Tristeza dos citros foi investigada com a detecção de CP-CTV em amostras de folhas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) infectadas ou não (controle). As amostras de citros foram identificadas qualitativamente como infectadas positiva ou negativamente usando reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Os resultados obtidos usando o imunoensaio desenvolvido são apresentados na figura 3.14. Como podem ser observados, os níveis de CP-CTV obtidos para amostras de plantas infectadas pelo vírus apresentaram valores superiores aos das amostras controle, indicando a eficácia do procedimento proposto em discriminar as amostras doentes das saudas, o que facilita o diagnóstico simples e rápido da doença Tristeza dos citros. As amostras também foram avaliadas por ELISA, nas quais as concentrações de CP-CTV obtidas mostraram excelente concordância com os valores obtidos em nosso sistema. Os resultados obtidos com os dois métodos mostraram uma correlação de 0,98, e a aplicação do teste *t* de *Student* para amostras pareadas não mostrou diferença significativa ao nível de confiança de 95%, confirmando a exatidão dos resultados. O custo em materiais para a construção do imunossensor foi de cerca de R\$ 1,00 por eletrodo. Esse valor é consideravelmente menor quando comparado com o ensaio ELISA, usado no estudo comparativo, que foi de cerca de R\$ 33,00 por micropoço, indicando o baixo custo do método desenvolvido. É importante lembrar que os custos dos insumos utilizados em pesquisa tem

valores diferentes daqueles praticados para as empresas, o que deve baixar ainda mais o custo final do dispositivo. Assim, o imunoenensaio-magnético proposto apresentou significativos resultados para detecção do CTV de forma simples e de baixo custo em amostras reais.

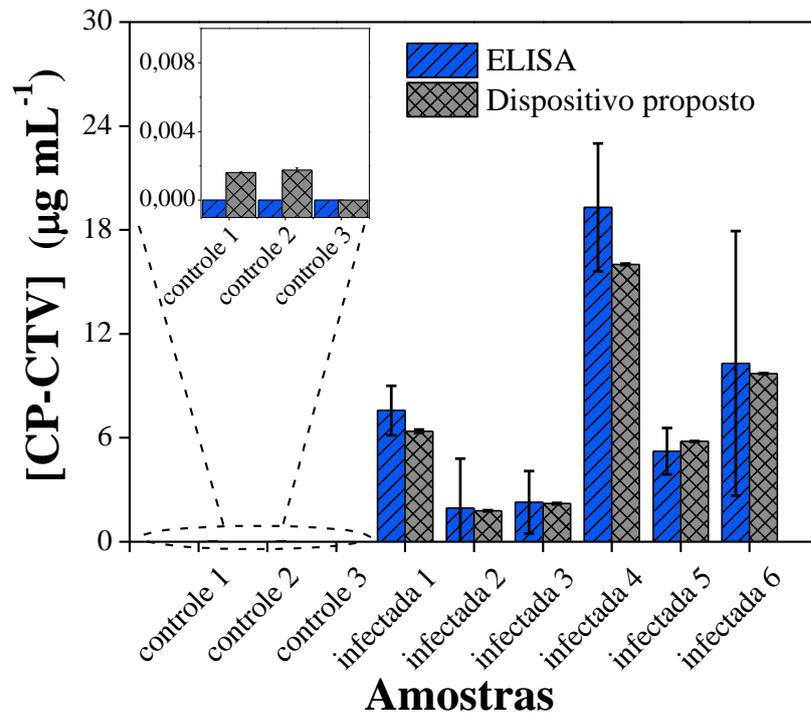


FIGURA 3.14 - Gráficos de barras para as concentrações de CP-CTV em amostras de plantas sadias e infectadas com o *Citrus tristeza virus* usando o DE $\mu$ D e o método comparativo ELISA.

### 3.4 - CONCLUSÃO PARCIAL

Demonstramos que a combinação da separação imunomagnética e um dispositivo descartável com imunoarranjo microfluídico permitiu a rápida detecção do *Citrus tristeza virus* com alta seletividade e baixo custo. O dispositivo desenvolvido permitiu a detecção do biomarcador com boa sensibilidade, atingindo um baixíssimo limite de detecção de  $0,3 \text{ fg mL}^{-1}$ . Além disso, em condições otimizadas não foi observado efeito de matriz devido à captura e separação do analito da amostra, com base na imunocaptura magnética, o que ocorreu devido ao uso de PMs decoradas com anti-CP-CTV. O procedimento desenvolvido foi aplicado com sucesso para a determinação do CP-CTV em amostras de cultivares de citros em menos de 50 minutos. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparáveis aos do método ELISA, demonstrando o potencial do procedimento para um diagnóstico da doença de forma rápida, simples e com custo reduzido. Essa nova estratégia mostra-se promissora no monitoramento da doença em culturas cítricas, e imaginamos que sua implementação no mercado para o diagnóstico precoce certamente traria um melhor controle e prevenção da doença, com grandes benefícios para o setor.

*Desenvolvimento e comparação de imunoensaios  
enzimático e não-enzimático visando a detecção  
eletroquímica do cancro cístico*

*Capítulo 4*

## **4 - DESENVOLVIMENTO E COMPARAÇÃO DE IMUNOENSAIOS ENZIMÁTICO E NÃO-ENZIMÁTICO VISANDO A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO CANCRO CÍTRICO**

### **4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Esta parte do trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo do desempenho de um imunoenensaio enzimático e outro não-enzimático para a detecção eletroquímica da trealase, um potencialmente novo biomarcador proteico para o cancro cítrico. O sistema enzimático utiliza a HRP como marcador eletroquímico, enquanto o imunoenensaio não-enzimático utiliza nanopartículas de ouro para essa mesma função, sendo que ambos os sistemas visam obter alta sensibilidade, baixo custo e portabilidade.

### **4.2 - PARTE EXPERIMENTAL**

#### **4.2.1 - Reagentes e materiais**

A proteína trealase (TREA), extraída da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, foi cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar. O anticorpo policlonal anti-TREA (produzido em coelho) foi adquirido da Proteimax Biotechnology (São Paulo, BR). As partículas magnéticas decoradas com grupos carboxilas foram sintetizadas pelo método de co-precipitação (descrito no item 4.2.3 abaixo). Para esse processo, foram utilizados os reagentes sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,6\%$ ) e hidróxido de sódio (NaOH), ambos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, BR); cloreto férrico hexahidrato ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98\%$ ) e citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 99,8%) adquiridos junto à

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Os demais reagentes e materiais utilizados foram descritos no capítulo anterior (item 3.2.1).

## **4.2.2 - Instrumentação**

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas com um microscópio modelo JEOL JEM 200CX, operado a uma tensão de 200 keV e equipado com um espectrômetro de raios-X de energia dispersiva. A caracterização das nanopartículas magnéticas e sua modificação foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), usando o espectrômetro FTIR-4100. Os demais equipamentos utilizados neste trabalho já foram descritos no capítulo anterior (item 3.2.2).

## **4.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais**

### *4.2.3.1 - Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com citrato*

As nanopartículas de ouro utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo método de Turkevich, no qual o citrato é usado como agente redutor e estabilizante<sup>112</sup>. Resumidamente, 100 mL de uma solução de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ,  $1,40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi aquecida em banho-maria até atingir a temperatura de  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação constante (*ca.* 850 rpm). Em seguida, um volume de 10,0 mL de citrato de sódio (1% m/v) foi adicionado à solução de  $\text{HAuCl}_4$ , mantendo-a sob aquecimento e agitação por 4 minutos. Nesse intervalo, foi observada uma mudança na coloração de amarelo pálido para roxo escuro e, após esse tempo, a solução foi resfriada em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Por fim, as nanopartículas de ouro foram armazenadas sob refrigeração até sua utilização.

#### 4.2.3.2 - Síntese e modificação das nanopartículas magnéticas

Em alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa foram desenvolvidos imunoenaios utilizando nanopartículas magnéticas (NPMs) sintetizadas em laboratório e os resultados indicaram que os procedimentos são tão sensíveis quanto os que utilizam partículas comerciais, com a vantagem de menor custo de análise<sup>113-115</sup>. Assim, os sistemas aqui propostos envolveram o uso dessas nanopartículas para imobilização covalente de anticorpos policlonais anti-TREA. As NPMs foram sintetizadas de acordo com o método de coprecipitação relatado por Proença et al.<sup>113,114</sup>. Obedecendo a estequiometria 2:1 para relação Fe(III)/Fe(II), os sais de ferro  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparados em uma solução de HCl ( $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ), e aquecidos a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Paralelamente, uma solução de NaOH ( $1,50 \text{ mol L}^{-1}$ ) também foi aquecida até  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, a solução de NaOH foi misturada à solução dos precursores de ferro e mantida sob agitação por 30 minutos a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ao fim dessa etapa, o líquido resultante foi deixado resfriar até temperatura ambiente e, então as NPMs foram lavadas com água até neutralização, com posterior separação aplicando um campo magnético externo (ímã neodímio).

Na etapa posterior, as nanopartículas magnéticas foram funcionalizadas com citrato. Inicialmente, as NPMs recém-sintetizadas foram adicionadas à solução de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $0,37 \text{ mol L}^{-1}$ ) e agitadas por 30 minutos a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Logo após, etapas de lavagens foram realizadas, com auxílio de um ímã de neodímio para separação magnética, até atingir a neutralização da solução do sobrenadante. Posteriormente, a dispersão foi mantida em atmosfera de  $\text{N}_2$  por 30 minutos e armazenada a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  para uso posterior.

#### 4.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor enzimático

O imunossensor enzimático foi baseado no mesmo princípio do dispositivo desenvolvido para detecção do CTV (capítulo 3), sendo assim as etapas serão resumidamente mencionadas, e estão representadas na figura 4.1.

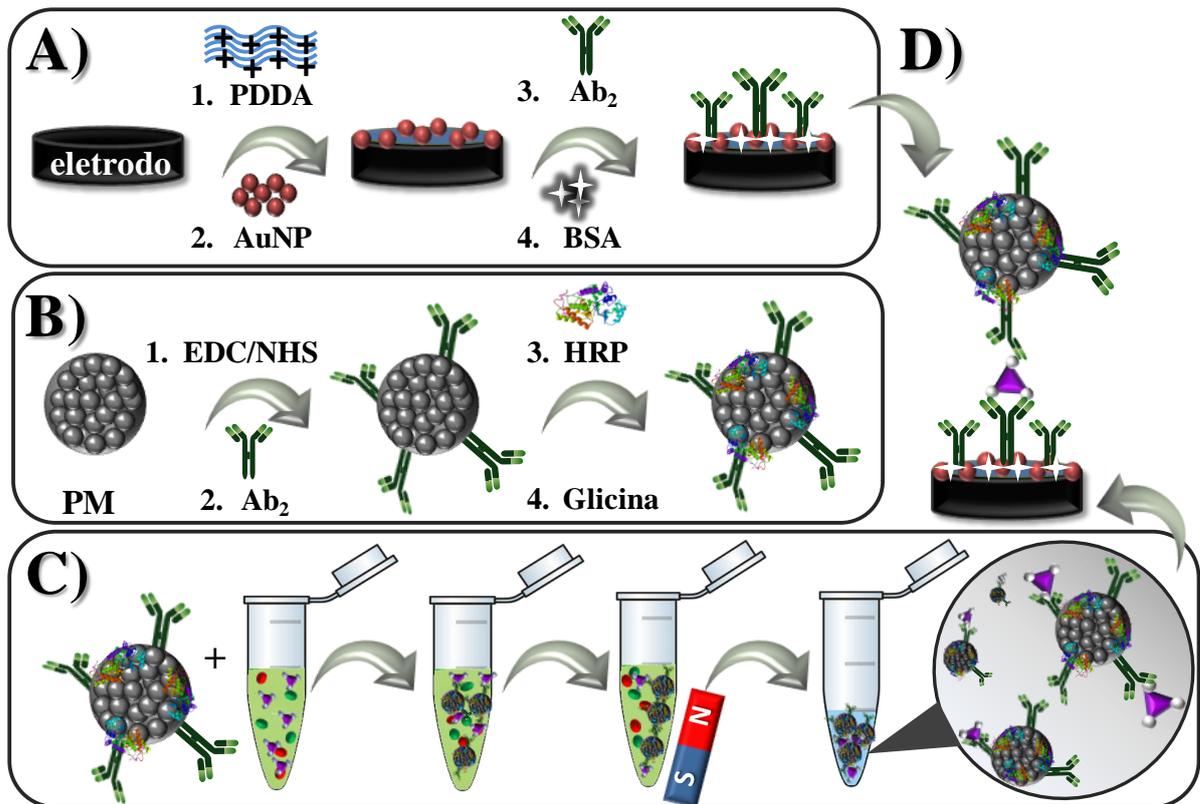


FIGURA 4.1 - Representação das etapas de preparação do imunossensor eletroquímico para detecção da TREA, sendo A) a imobilização de anti-TREA sob os eletrodos de trabalho do dispositivo microfluídico, B) as etapas para obtenção do biconjugado Ab<sub>2</sub>/NPM/HRP, C) a captura e isolamento da proteína TREA usando o Ab<sub>2</sub>/NPM/HRP e D) a formação da estrutura do tipo sanduíche sob o eletrodo para posterior análise eletroquímica.

Para construção deste imunossensor, os eletrodos serigrafados foram modificados com o polícatión PDDA (etapa A-1) e com as nanopartículas

de ouro decoradas com glutathione (etapa **A-2**), formando uma bicamada PDDA/AuNP-GSH. Os reagentes de reticulação EDC/NHS foram utilizados para a ativação dos grupos carboxilas presentes nas nanopartículas de ouro/glutathione para a imobilização dos anticorpos policlonais anti-TREA. Após a lavagem, 5  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Ab}_2$  (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionada à superfície do eletrodo contendo os grupos carboxilas ativados (etapa **A-3**). Essa solução foi mantida por 18 horas a 4 °C, e os eletrodos foram posteriormente lavados com PBS e bloqueados com BSA (etapa **A-4**). Todos os tempos, concentrações dos reagentes e etapas de lavagem seguiram o mesmo protocolo do item 3.2.4.2, salvo quando indicado. Após a imobilização do  $\text{Ab}_2$ , o dispositivo microfluídico foi montado e estocado a 4 °C.

A conjugação das proteínas nas nanopartículas sintetizadas seguiu o protocolo de Proença et al. (figura 4.1 B)<sup>113</sup>. Inicialmente, um volume de 1,0 mL da dispersão de NPMs (concentração de 5,0  $\text{mg mL}^{-1}$  e com diâmetro médio de 5,0 nm) foi adicionado a um microtubo, e lavado duas vezes com 1,0 mL de tampão MES (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,2), tendo um suporte magnético para auxiliar na separação do sobrenadante. Depois disso, 500  $\mu\text{L}$  de solução de EDC/NHS (3,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) foi adicionada às NPMs e mantidos sob agitação lenta por 30 minutos (etapa **B-1**). Após lavagens usando 500  $\mu\text{L}$  de MES, foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de anti-TREA (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) à dispersão de NPMs e deixados por 24 horas em agitação lenta (etapa **B-2**). O complexo  $\text{Ab}_2$ -NPM foi lavado com PBS (pH 7,0) e 500  $\mu\text{L}$  de solução contendo a enzima HRP (1,2  $\text{mg mL}^{-1}$  em PBS (pH 7,0) com 0,5% (m/v) de BSA) foram adicionados (etapa **B-3**). Após 16 horas sob agitação suave, o bioconjugado ( $\text{Ab}_2$ -NPM-HRP) formado foi lavado e 1,0 mL de solução de glicina (1,0  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 8,0) foi adicionada para o bloqueio de grupos ativados com EDC/NHS que não reagiram (etapa **B-4**). Após lavagens com PBS 7,4 + 2% (m/v) de BSA, o biconjugado foi disperso em 250  $\mu\text{L}$  de PBS-TW.

A etapa de captura da proteína (figura 4.1 C) foi realizada utilizando diferentes concentrações de solução padrão de TREA ou amostras de plantas diluídas em PBS (pH 7,4). Assim, 20  $\mu\text{L}$  do bioconjugado  $\text{Ab}_2\text{-NPM-HRP}$  foi adicionado a 500  $\mu\text{L}$  da solução de TREA ou amostra, e mantidos sob agitação lenta por 40 minutos (parâmetro otimizado) a 37 °C. Em seguida, a suspensão foi lavada e ressuspensa em 125  $\mu\text{L}$  com PBS-TW. Por fim, uma alíquota 100  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foi injetada no dispositivo microfluídico usando uma válvula cromatográfica de injeção manual, e o fluxo foi interrompido para formação da estrutura tipo sanduíche na superfície do eletrodo (figura 4.1 D). Após 40 minutos de interação, o canal foi lavado injetando solução de PBS-TW pH 6,5 e as análises amperométricas foram realizadas adicionando a solução de detecção composta por 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como fluido transportador foi empregado o tampão PBS-TW pH 6,5. Para a detecção, um potencial de  $-0,2\text{ V vs Ag|AgCl}$  foi aplicado continuamente e a corrente catódica gerada foi registrada e utilizada como parâmetro analítico<sup>116</sup>.

#### **4.2.5 - Desenvolvimento do imunoenensaio não-enzimático**

Nesta abordagem, a detecção da proteína TREA foi realizada utilizando as AuNPs como marcador eletroquímico e as NPMs para pré-concentração do analito, não havendo nenhuma modificação na superfície do eletrodo de trabalho uma vez que a estrutura tipo sanduíche foi formada sobre a superfície das NPMs<sup>100,117,118</sup>. Toda a reação anticorpo-antígeno foi realizada em microtubos e não foi necessário o uso de um sistema microfluídico. O esquema representativo para este imunoenensaio está na figura 4.2.

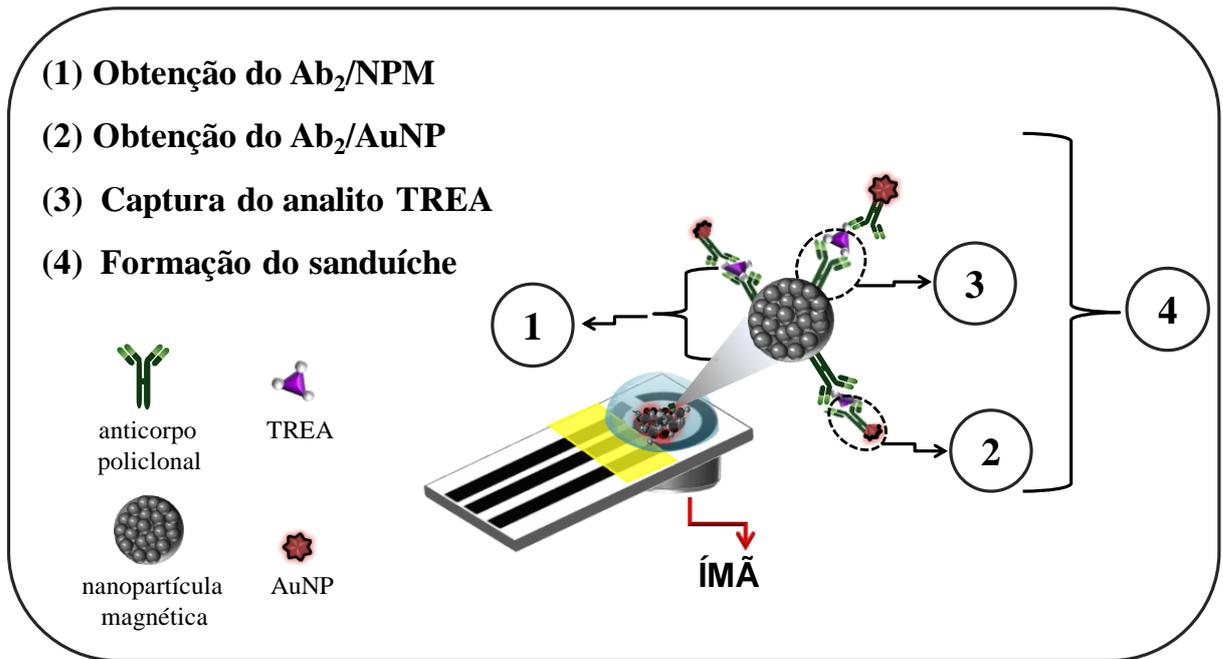


FIGURA 4.2 - Esquema das etapas necessárias para obtenção do imunossensaio não-enzimático: (1) Preparação do conjugado contendo nanopartículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais de captura ( $Ab_2$ ); (2) imunoconjugação das AuNPs com anti-TREA ( $Ab_2$ ); (3) captura do biomarcador TREA com  $Ab_2/NPMs$  e (4) formação da estrutura tipo sanduíche nas NPMs e posterior detecção eletroquímica.

#### 4.2.5.1 - Conjugação das nanopartículas magnéticas com anti-TREA

Os anticorpos anti-TREA foram covalentemente ligados às NPMs pela formação de uma ligação amida com uso de EDC/NHS, seguindo o mesmo protocolo de imobilização aplicado no imunossensaio enzimático (item 4.2.4), com exceção da etapa de imobilização da enzima. Assim, 1,0 mL de dispersão das nanopartículas ( $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi lavada com tampão MES pH 5,2 (2 vezes) e ativada com a solução mista de EDC/NHS ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) por 30 minutos, sob agitação suave. Transcorrido esse tempo, três lavagens com  $500 \mu\text{L}$  de MES foram realizadas e  $250 \mu\text{L}$  de anti-TREA ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionados às NPMs, mantendo-os por 24 horas sob agitação lenta. Os anticorpos não ligados

foram removidos após a separação magnética e o conjugado foi lavado com PBS-TW. Em seguida, 1,0 mL de solução de glicina ( $1,0 \text{ mol mL}^{-1}$ , pH 8,0) foi usado para etapa de bloqueio por 30 minutos. Posteriormente, o Ab<sub>2</sub>-NPM foi lavado com PBS-TW, ressuspensão em 250  $\mu\text{L}$  deste mesmo tampão e mantido sob refrigeração para uso posterior<sup>114</sup>. As etapas para obtenção do conjugado Ab<sub>2</sub>-NPM estão representadas na figura 4.3.

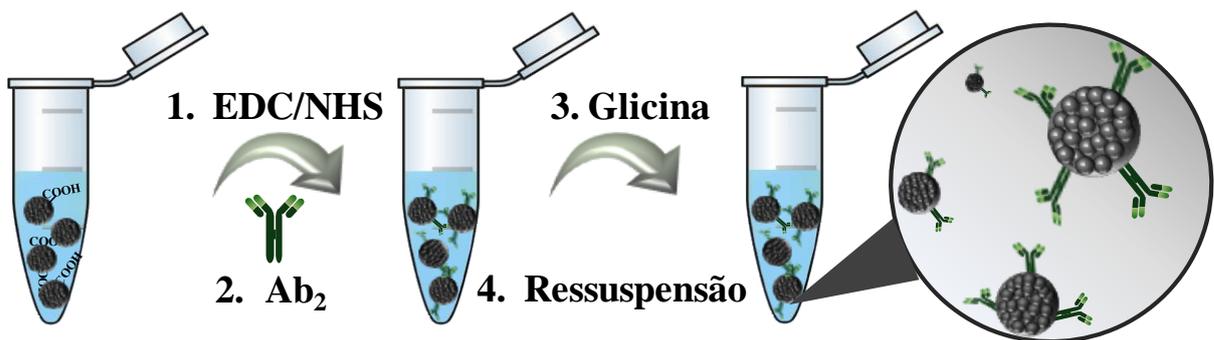


FIGURA 4.3 - Representação das etapas para conjugação das NPMs com anti-TREA, usando os reagentes EDC/NHS para ativar os grupos carboxilas e aumentar o rendimento da ligação amida formada.

#### 4.2.5.2 - Imunoconjugação das AuNPs com anti-TREA

Paralelamente ao item anterior, anticorpos policlonais foram marcados com as AuNPs conforme o esquema da figura 4.4. Para isso, a suspensão de nanopartículas de ouro modificadas com citrato foi ajustada para pH 8,5 usando tampão borato ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e, em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de anti-TREA ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi adicionado a 1,0 mL dessa dispersão. Após agitação suave por 20 minutos à temperatura ambiente, 100  $\mu\text{L}$  de BSA (2% m/v) foram adicionados e incubados por mais 20 minutos. A dispersão resultante contendo Ab<sub>2</sub>-AuNPs foi centrifugada por 20 minutos a 6500 rpm, e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de PBS (pH 7,4) com 0,3% (m/v) de BSA.



FIGURA 4.4 - Esquema representativo da estratégia de bioconjugação das AuNPs com Ab<sub>2</sub>.

#### 4.2.5.3 - Captura do biomarcador TREA com Ab<sub>2</sub>/NPMs e formação do imunoenensaio do tipo sanduíche

A fim de realizar a captura, separação e pré-concentração da proteína TREA, utilizou-se o conjugado Ab<sub>2</sub>-NPM conforme apresentado na figura 4.5 A. Assim, 25  $\mu$ L da dispersão de Ab<sub>2</sub>-NPM foi adicionada a 500  $\mu$ L de diferentes concentrações de TREA (diluídos em PBS com pH 7,4) e incubado por 30 minutos a 37 °C. Depois disso, o complexo formado (TREA/Ab<sub>2</sub>-NPM) foi separado do sobrenadante aplicando um campo magnético externo e lavado com PBS-TW. Após três etapas de lavagem, o sobrenadante foi descartado e o complexo foi ressuspensão em 140  $\mu$ L de Ab<sub>2</sub>-AuNPs, seguido por agitação por 20 minutos. Essa etapa corresponde à formação do sanduíche no imunoenensaio e está representada na figura 4.5 B. O imuno-sanduíche formado foi novamente separado magneticamente, lavado com tampão PBS-TW e, finalmente foi ressuspensão em 80  $\mu$ L de PBS (pH 7,4) com 0,3% de BSA para posterior análise eletroquímica.

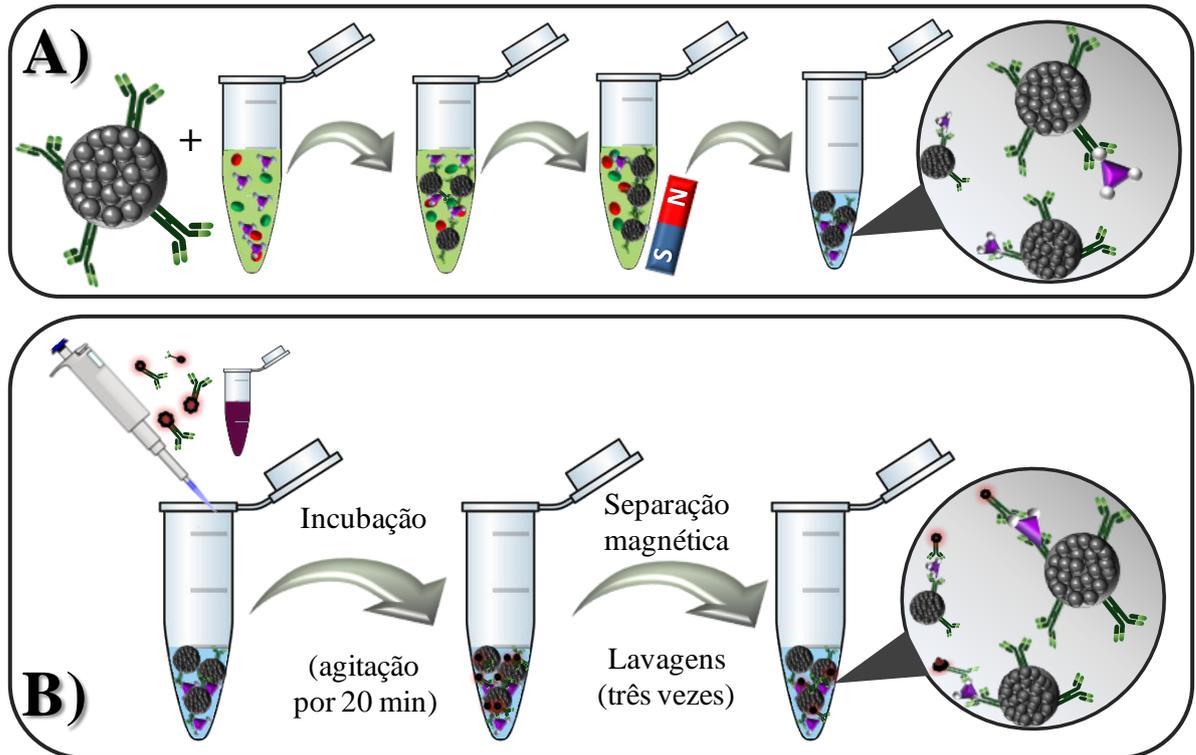


FIGURA 4.5 - Etapas de interação do imunoenensaio proposto. A) Captura da proteína TREA após a adição do conjugado  $Ab_2$ -NPM à solução padrão ou amostra, juntamente com as etapas de separação magnética e lavagem. B) Formação da estrutura do tipo sanduíche usando TREA/ $Ab_2$ -NPM e as nanopartículas marcadas com anti-TREA após tempo de incubação.

#### 4.2.5.4 - Detecção eletroquímica usando DPV

Para as medidas eletroquímicas, uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  do imunossanduíche ( $AuNP$ - $Ab_2$ /TREA/ $Ab_2$ -NPM) foi adicionada sobre a superfície do eletrodo de trabalho e capturada com auxílio de um ímã de neodímio localizado externamente sob a área do eletrodo. Para garantir o máximo de captura do imuno-sanduíche, o sobrenadante foi retirado por retropipetagem após um minuto da adição da dispersão ao eletrodo e, em seguida,  $50 \mu\text{L}$  de HCl ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionado sobre toda a célula eletroquímica. O sinal analítico foi baseado na resposta redox do ouro, presente nas nanopartículas, em meio ácido na presença de íons cloreto. Assim, inicialmente um potencial de  $+1,25 \text{ V}$

foi aplicado por 120 s e, em seguida, a DPV foi realizada na faixa de potencial +1,25 a 0,0 V vs Ag|AgCl com amplitude de modulação de 50 mV, potencial de *step* de 5 mV e velocidade de varredura de 0,01 V s<sup>-1</sup>. Os parâmetros utilizados para a DPV foram baseados em trabalhos previamente reportados<sup>100,117,119</sup>.

#### **4.2.6 - Preparação das amostras de plantas**

As amostras de folhas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) não-infectadas e infectadas com a doença cancro cítrico foram cedidas pela Fundecitrus e submetidas ao mesmo processo de extração descrito no item 3.2.5. Resumidamente, as folhas foram moídas/trituradas e dispersas em tampão Tris (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) na proporção 1:6 (m/v). O extrato foi centrifugado a 3500 rpm e o sobrenadante foi separado e armazenado a -20 °C. Para aplicação nos imunoenaios propostos, uma alíquota do extrato foi diluída em PBS pH 7,4<sup>116</sup>. O método comparativo foi realizado com o kit ELISA adquirido pela Proteimax Biotechnology (São Paulo, BR).

### **4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1 - Caracterização das NPMs**

As estratégias propostas para detecção da proteína TREA envolveram o uso de imunoenaios enzimático e não-enzimático, a fim de comparar estes dois procedimentos e avaliar o potencial deste biomarcador para o diagnóstico da doença cancro cítrico. Assim, nanopartículas magnéticas sintetizadas no laboratório e funcionalizadas com grupos carboxilas foram utilizadas no desenvolvimento dos imunoenaios enzimático e não-enzimático, visando garantir a imobilização covalente dos anticorpos policlonais anti-TREA e, conseqüentemente, favorecer a fácil captura do biomarcador proteico,

evitando possíveis efeitos de matriz e diminuindo as adsorções inespecíficas<sup>67,68,120</sup>. Assim, a obtenção das NPMs foi confirmada e caracterizada pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, espectrometria de energia dispersiva de raio-x e espectroscopia de infravermelho, e estão apresentadas na figura 4.6.

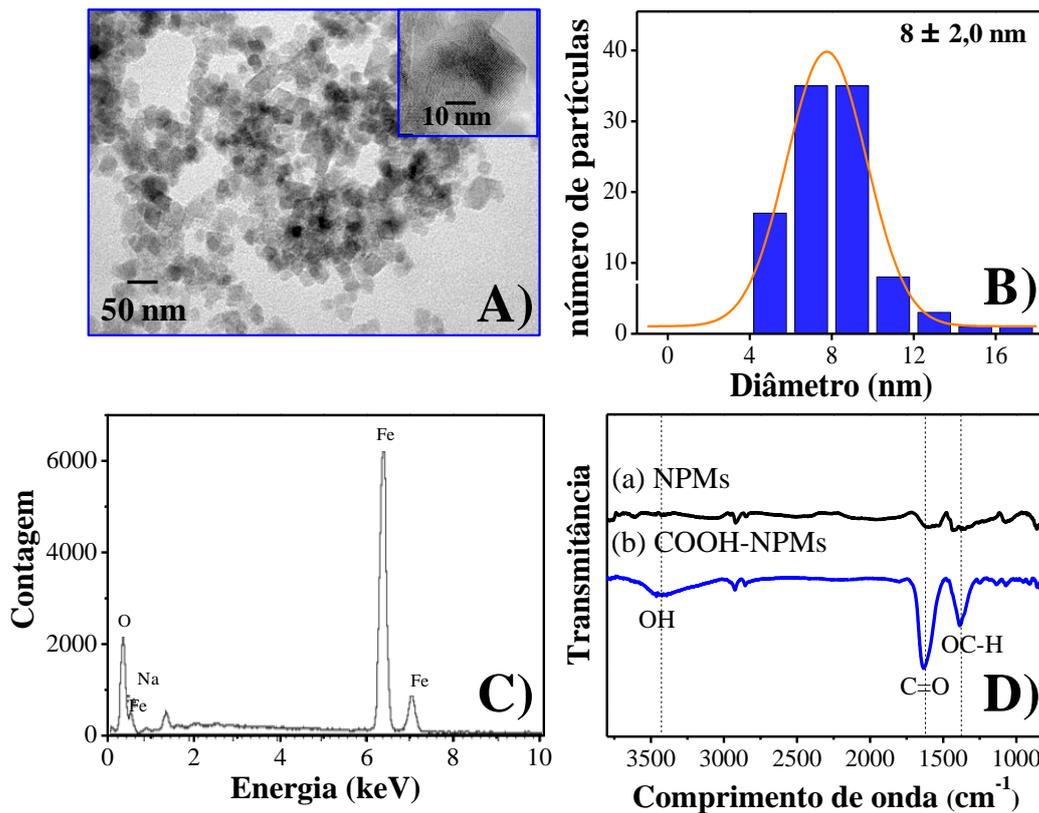


FIGURA 4.6 - Caracterização das NPMs por A) microscopia eletrônica de transmissão; B) distribuição do diâmetro das nanopartículas pelo software *ImageJ*; C) espectros de energia dispersiva de raio-x das NPMs sem modificação, evidenciando os picos referente ao ferro e D) espectros de infravermelho com transformada de Fourier para NPMs (a) não modificados e (b) modificadas com citrato.

As imagens obtidas via MET (figura 4.6 A) demonstram que o material obtido possui estrutura homogênea, com partículas semi-esféricas e

presença de agregados devido à grande razão superfície/volume, que resulta em uma alta energia de superfície. Também foram medidos os diâmetros dessas nanopartículas, com o software *ImageJ*, e foi obtido um valor médio de  $8 \pm 2$  nm (figura 4.6 B)<sup>113,115,121</sup>. Análises de EDX (figura 4.6 C) confirmaram a composição majoritária de ferro nas NPMs, apresentando intensos picos em 6,40 e 7,06 KeV que correspondem às energias  $K\alpha$  e  $K\beta$  do ferro, respectivamente<sup>121,122</sup>. A figura 4.6 D apresenta espectros de FTIR que confirmam a funcionalização das nanopartículas com citrato, no qual pode ser observado o surgimento de um pico intenso em  $1626\text{ cm}^{-1}$  após a modificação, que é resultante do alongamento da ligação carbonila, e uma banda larga na região de  $3012\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  da hidroxila proveniente do grupo  $\text{COOH}$ <sup>121,122</sup>.

### **4.3.2 - Caracterização das AuNPs e de sua conjugação com Ab<sub>2</sub>**

No imunoenensaio não-enzimático as nanopartículas de ouro foram utilizadas como marcadores eletroquímicos em substituição às enzimas, e desta forma, sua síntese tem grande relevância no processo de imunodeteção. Assim, após a obtenção dessas nanopartículas, a técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar seu tamanho e homogeneidade, sendo os resultados apresentados na figura 4.7 A. De acordo com a micrografia, um formato esférico e homogêneo foi observado, com uma distribuição de diâmetro de  $12 \pm 3$  nm (figura 4.7 B)<sup>123</sup>.

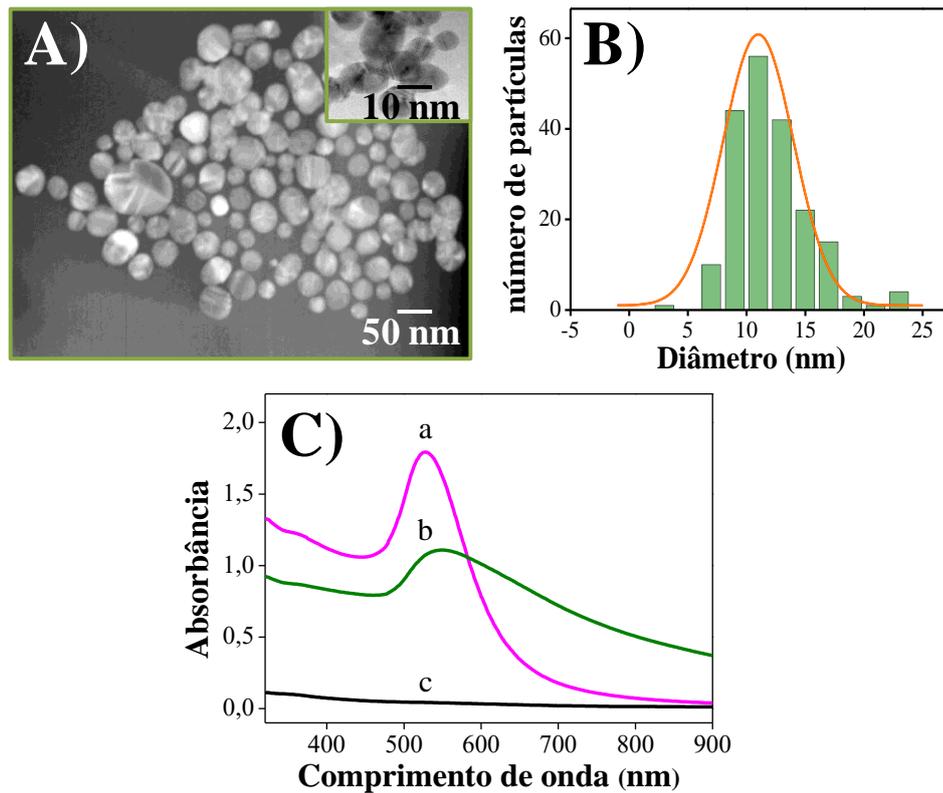


FIGURA 4.7 - A) Caracterização morfológica das AuNPs por microscopia eletrônica de transmissão; figura inserida: distribuição do diâmetro das nanopartículas usando software *ImageJ*. B) Espectros de absorção do visível das (a) AuNPs, (b) AuNPs conjugadas com anti-TREA e (c) solução de anti-TREA.

Para a caracterização da conjugação dos anticorpos policlonais e AuNPs, foram utilizados espectros de absorção na região do visível (figura 4.7 C). Para isso, foi avaliada a mudança de coloração das AuNPs devido suas propriedades ópticas típicas, que dependem da distância de separação entre partículas e também de sua agregação <sup>124</sup>. Como é observado na figura 4.7 C (a), a suspensão de AuNPs apresenta uma intensa banda de absorção de plasmon em 528 nm. No entanto, após conjugação das nanopartículas com anti-TREA (figura 4.7 C (b)), é observado o alargamento e a diminuição da intensidade nessa banda de absorção. Além disso, um desvio de cerca de 20 nm, entre os espectros é observado ao comparar a suspensão de AuNPs (528 nm,) com o imunocjugado AuNP-Ab<sub>2</sub> (548 nm), indicando a diferença no ambiente

dielétrico. O perfil dos espectros levantados está de acordo com os principais trabalhos relatados na literatura<sup>118</sup>, confirmando a eficiência na conjugação do anti-TREA na superfície das AuNPs. Os espectros do visível da solução anti-TREA (figura 4.7 C (c)) foram realizados para demonstrar que os anticorpos não apresentam nenhuma banda de absorção nessa faixa do espectro eletromagnético.

### **4.3.3 - Otimização dos parâmetros experimentais**

Variáveis experimentais como pH, temperatura de reação antígeno/anticorpo, concentração de anticorpos, tempo para captura do analito e tempo de formação do sanduíche influenciam diretamente na sensibilidade e seletividade do imunossensaio. Além disso, as condições experimentais ideais para o reconhecimento do alvo de um anticorpo podem não ser as mesmas para outro. Deste modo, foram avaliados os principais parâmetros para os dois imunossaios propostos para detecção do biomarcador trealase, buscando alcançar melhor resposta analítica e, conseqüentemente, maior sensibilidade do imunossensor.

#### *4.3.3.1 - Otimização do imunossensor enzimático*

Para esta estratégia, utilizou-se a enzima HRP como marcador eletroquímico. A enzima foi imobilizada nas nanopartículas magnéticas contendo anti-TREA, que posteriormente foram usadas para capturar o biomarcador TREA. Além disso, também foi utilizado um dispositivo microfluídico contendo eletrodos serigrafados e com anti-TREA imobilizados em sua superfície. As respostas amperométricas foram geradas aplicando um potencial de -0,2 V vs. Ag|AgCl, explorando a reação enzimática da HRP com hidroquinona/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reação descrita no item 3.3.3).

As variáveis avaliadas na resposta deste imunossensor foram: concentração do anticorpo anti-TREA na superfície do eletrodo; tempo de captura do biomarcador TREA usando o bioconjugado Ab<sub>2</sub>/NPM/HRP; tempo de formação do sanduíche na superfície do dispositivo e estudo da vazão. As demais condições experimentais envolvidas na construção do imunossensor enzimático foram relatadas em trabalhos anteriores<sup>97,116</sup>. Para maior sensibilidade na detecção de TREA, o critério de seleção usado para cada variável testada foi o maior sinal de corrente de pico em relação ao menor consumo de reagente ou menor tempo. Os resultados obtidos são mostrados na figura 4.8.

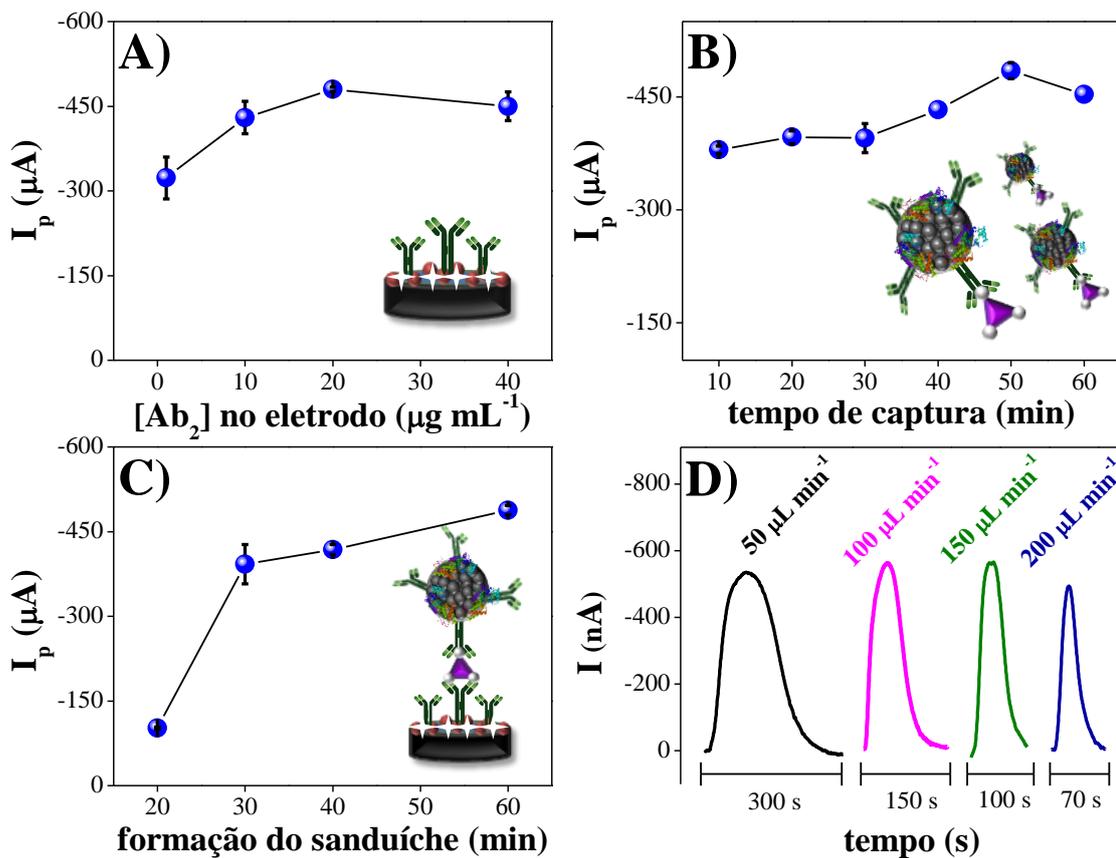


FIGURA 4.8 - Otimizações das etapas do imunossensor com HRP para detecção de TREA ( $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ ): A) resposta das diferentes concentrações de anti-TREA na superfície do eletrodo; B) estudo do tempo de captura da proteína usando o bioconjugado; C) efeito do tempo de formação do imunossanduíche e

D) respostas amperométricas para diferentes vazões da solução de detecção (solução mista contendo  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}/\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Todas as otimizações foram realizadas empregando  $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$  da proteína TREA diluída em PBS,  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de anti-TREA conjugado na NPM e adição de  $100 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de detecção (solução mista contendo  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) no canal microfluídico. O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração de anti-TREA a ser imobilizada na superfície do eletrodo. A figura 4.8 A mostra o comportamento das correntes de pico para as concentrações variando de  $5$  a  $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , no qual pode ser observado um acréscimo nos sinais transientes de corrente de pico com o aumento da concentração do anticorpo policlonal até  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , ocorrendo uma pequena diminuição na  $I_p$  para concentrações superiores. Assim,  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  foi utilizada como concentração ideal de  $\text{Ab}_2$  para imobilização no eletrodo.

Em relação aos tempos de captura do biomarcador e de formação do sanduíche, os resultados são apresentados nas figuras 4.8 B e C, respectivamente. Para estes estudos, maiores tempos de interação promoveram um incremento nos sinais de corrente de pico. No entanto, visando obter o compromisso maior sinal/menor tempo de análise, os estudos subsequentes foram realizados empregando 40 minutos tanto para captura da trealase quanto para formação da estrutura do tipo sanduíche.

Também foram avaliadas diferentes vazões para o carreamento da solução de detecção, apresentadas na figura 4.8 D. As vazões estudadas foram de  $50$ ,  $100$ ,  $150$  e  $200 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ , e se pode observar similaridade para as três primeiras vazões, porém os perfis dos sinais transientes de correntes foram diferentes, sendo este o principal fator para escolha deste parâmetro. Em vazões mais baixas ( $50 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ ), ocorreu maior dispersão da solução de detecção, obtendo-se um pico mais alargado e com maior tempo de residência. Em contraste, para vazões mais elevadas ( $200 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ ) picos bem definidos,

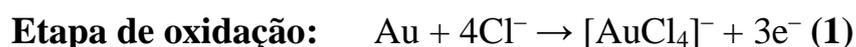
com baixo tempo de residência foram obtidos, porém foi gerado um sinal com menor magnitude. Para as vazões de 100 e 150  $\mu\text{L min}^{-1}$ , uma excelente relação entre intensidade de sinal, tempo de residência e definição de pico foram alcançados, indicando que nestas condições uma alta concentração de benzoquinona sofreu a redução na superfície do eletrodo. Entre essas duas vazões, 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  foi a que apresentou maior intensidade de sinal e menor desvio padrão, sendo esta vazão utilizada neste imunossensor.

#### 4.3.3.2 - *Otimização do imunoenensaio não-enzimático*

O imunoenensaio não-enzimático utilizou uma estratégia um pouco mais simples para detecção de TREA, em que nenhuma modificação foi realizada na superfície do eletrodo de trabalho e todas as etapas de imunorreacção foram feitas em microtubos, levando a formação de uma estrutura tipo sanduíche sobre as NPMs. Além disso, a substituição do marcador eletroquímico enzimático HRP por nanopartículas de ouro tornou o dispositivo mais simples e versátil, não necessitando de válvulas e dispositivos para propulsão de fluidos, e, portanto levando a um método de análise de menor custo. Nesta estratégia, não foi necessário o uso de gás nitrogênio para remoção do oxigênio dissolvido nas soluções utilizadas nas etapas de detecção, ocasionando em uma maior praticidade do sistema. Sendo assim, anticorpos anti-TREA foram conjugados às NPMs, que serviram para capturar a proteína TREA, que posteriormente interagiu com anticorpos policlonais específicos para TREA que se encontravam marcados com a AuNP, resultando em um imunoenensaio do tipo sanduíche. Este complexo foi incorporado à superfície do eletrodo com auxílio de um ímã, sendo avaliado por meio da resposta redox do ouro presente nas nanopartículas.

A detecção da proteína TREA foi indiretamente realizada por meio das propriedades eletroquímicas das AuNPs e que são proporcionais à concentração da proteína capturada. Assim, inicialmente foi realizada a

oxidação do ouro presente nas AuNPs em meio ácido na presença de íons cloreto, com aplicação de um potencial fixo de +1,25 V vs. Ag|AgCl por 120 s, levando a formação de  $[\text{AuCl}_4]^-$  (etapa 1). Em seguida, a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) foi aplicada, resultando em um sinal analítico devido à redução de  $[\text{AuCl}_4]^-$  com potencial pico em +0,45 V (etapa 2)<sup>119</sup>. O mecanismo de reação pode ser resumido da seguinte forma:



Os parâmetros como concentração de  $\text{Ab}_2$ , tempo de captura e tempo de formação do sanduíche também foram avaliados para esta estratégia, visto que os procedimentos utilizados para o desenvolvimento deste imunossensaio são relativamente diferentes dos realizados para o imunossensaio com HRP. A concentração do biomarcador trealase usada para todas as otimizações foi  $1,95 \text{ pg mL}^{-1}$ , e as variáveis utilizadas na técnica de DPV foram as mesmas descritas na literatura<sup>100,117,119</sup>. Os valores de corrente de pico referente à redução do ouro em relação aos parâmetros otimizados estão apresentados na figura 4.9.

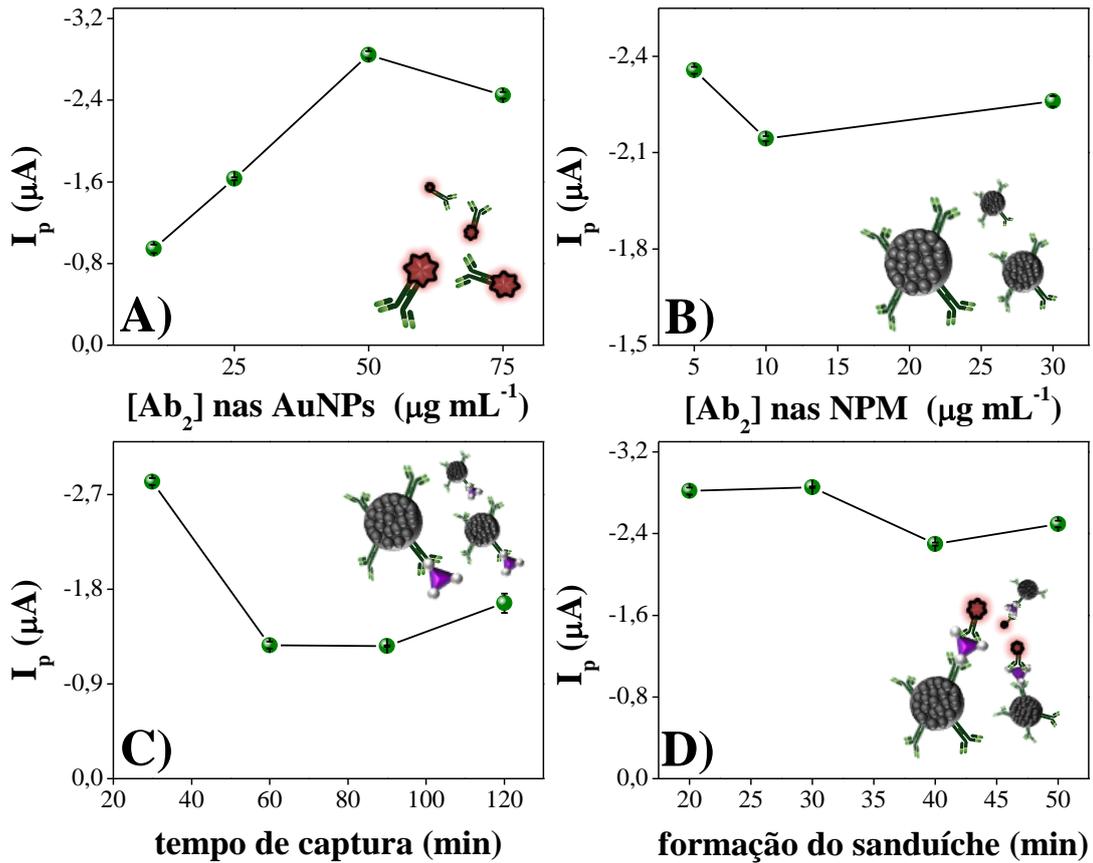


FIGURA 4.9 - Otimização das etapas do imunoenensaio com AuNPs para detecção da TREA ( $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): A) Estudo de diferentes concentrações de anti-TREA para conjugação com as AuNPs; B) estudo da concentração de anti-TREA imobilizadas na superfície das NPMs; avaliação dos tempos de C) captura da proteína TREA e D) formação do sanduíche.

Primeiramente, a concentração de anti-TREA imobilizadas na superfície das AuNPs foi avaliada (figura 4.9 A). O estudo dessa variável é importante, pois a quantidade de anticorpos marcados está diretamente relacionada ao número de ouro disponível para a reação, e conseqüentemente com o sinal de corrente. Um aumento na resposta voltamétrica foi obtido até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentração de anticorpo, atingindo uma saturação no sinal analítico para maiores concentrações. Portanto,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de anti-TREA foi selecionada para este trabalho por atingir maior desempenho voltamétrico. Com relação à concentração de anticorpos para captura da TREA, os resultados

são apresentados na figura 4.9 B. A concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  alcançou maiores valores de corrente de pico, ocorrendo uma diminuição no sinal para maiores concentrações. Esse efeito pode ser ocasionado por um impedimento estérico entre a interação antígeno/anticorpo, visto que grandes quantidades de anticorpos de captura são imobilizadas das nanopartículas magnéticas<sup>125</sup>. Assim,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi a concentração de anti-TREA utilizada para imobilização nas nanopartículas magnéticas nos estudos posteriores.

Além disso, o tempo para interação antígeno-anticorpo (ou captura do analito) e o tempo de formação do sanduíche foram avaliados entre 30 e 120 minutos e entre 20 e 50 minutos, respectivamente. Para o tempo de captura, verificou-se que 30 minutos proporcionou bons resultados, havendo um decréscimo no sinal após esse tempo de interação. Para formação do sanduíche, 20 minutos foi suficiente para obter uma boa correlação entre o imunoconjugado formado e um alto sinal analítico, sendo que a corrente de pico se manteve praticamente constante em tempos maiores. Assim, o tempo de captura de 30 minutos e o tempo de formação do sanduíche de 20 minutos foram usados para este imunoensaio, o que totalizou um tempo de análise de aproximadamente 55 minutos, considerando também a etapa de medida eletroquímica (aproximadamente 5 minutos).

#### **4.3.4 - Desempenho analítico dos imunoensaios propostos**

Como mencionado, a detecção com baixos limites de trealase para o diagnóstico da doença Cancro cítrico ainda não foi relatada na literatura, e desta forma, um estudo comparativo de dois procedimentos eletroquímicos foi proposto para avaliar o potencial de TREA no diagnóstico desta doença. Assim, o desempenho analítico dos imunoensaios propostos foi investigado mediante a construção da curva analítica utilizando diferentes concentrações do padrão de trealase diluídas em tampão PBS (pH 7,4). Sob as condições

otimizadas descritas anteriormente, o imunossensor enzimático apresentou faixa de trabalho com concentrações de TREA de  $25,0 \text{ fg mL}^{-1}$  a  $10,0 \text{ pg mL}^{-1}$ . A reação entre o analito e o imunossensor foi monitorada por meio da resposta de corrente de pico obtida a partir da redução da benzoquinona, fornecendo uma correlação com o logaritmo das concentrações de TREA, pela técnica de amperometria, com coeficiente de correlação linear de 0,995 (figura 4.10).

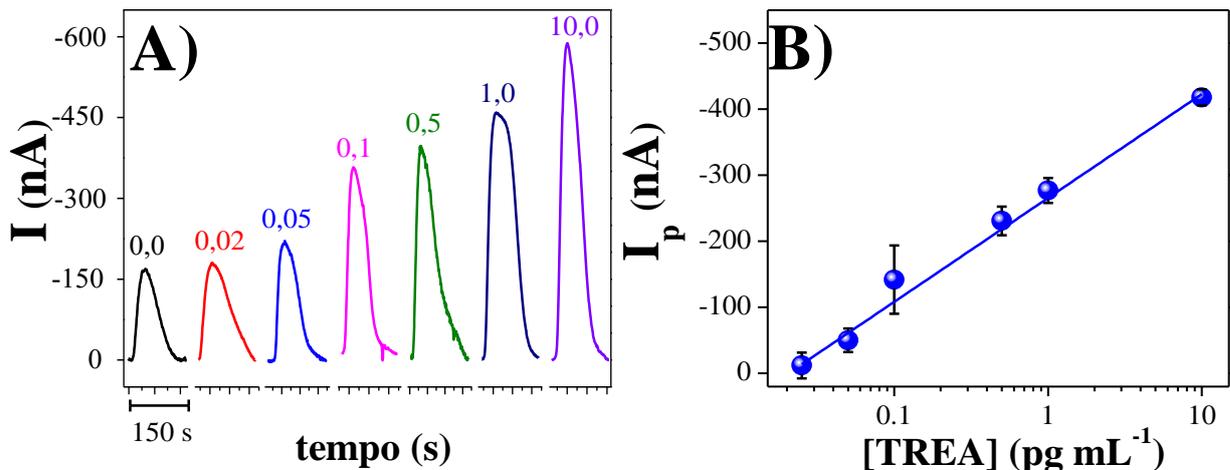


FIGURA 4.10 - A) Respostas dos sinais transientes para diferentes concentrações da proteína TREA em PBS (pH 7,4) a  $-0,2 \text{ V}$  vs. pseudo referência  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  após a injeção da mistura de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{Q}/\text{H}_2\text{O}_2$  e B) curva analítica para TREA ( $I$  (nA) x  $\log [\text{TREA}]$ ).

Para o imunoenensaio não-enzimático, a curva analítica foi obtida a partir da relação linear entre o valor da corrente de pico de redução devido a presença das nanopartículas de ouro com o logaritmo das concentrações de TREA, usando a técnica voltametria de pulso diferencial (figura 4.11 A). A linearidade alcançada para esse sistema é mostrada na figura 4.11 B, apresentando um coeficiente de correlação de 0,990 para concentração de TREA variando de  $1,0$  a  $62,5 \text{ pg mL}^{-1}$ . As características analíticas para ambos imunoenensaiois desenvolvidos estão resumidas na tabela 4.1.

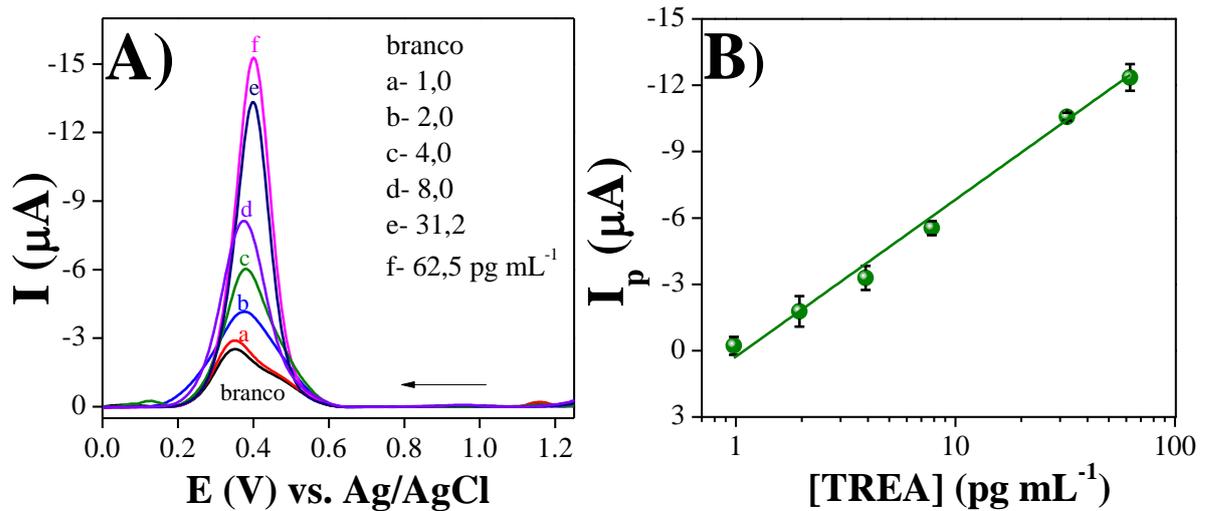


FIGURA 4.11 - A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir da resposta eletroquímica das AuNPs para diferentes concentrações de TREA e B) curva analítica para TREA ( $I$  (nA) x  $\log$  [TREA]).

TABELA 0.1 - Figuras de mérito dos imunoenaios eletroquímicos desenvolvidos para detecção de TREA.

Parâmetro	IMUNOENSAIO	
	Enzimático	Não-enzimático
Faixa linear ( $\text{pg mL}^{-1}$ )	0,025 – 10,0	1,0 – 62,5
$R^2$	0,995	0,990
Inclinação ( $\text{nA pg}^{-1} \text{ mL}$ )	157,2	7097,1
Intercepto ( $\text{nA pg}^{-1} \text{ mL}$ )	265,7	-273,7
LD* ( $\text{fg mL}^{-1}$ )	19	16

\* LD (limite de detecção) calculado de acordo com os critérios da IUPAC ( $\text{LD} = 3 \times s / b$ , sendo  $s$ : o desvio padrão do branco ( $n = 10$ ) e  $b$ : a inclinação da curva analítica).

Comparativamente, os dois sistemas apresentaram características analíticas relativamente distintas para detecção de TREA. Por exemplo, o

sistema enzimático atingiu uma faixa linear com menores concentrações de TREA, no entanto ambas as faixas lineares são adequadas, uma vez que não há um valor de corte estabelecido para esta proteína em amostras de plantas infectadas com cancro cítrico. Além disso, a sensibilidade do imunossensor enzimático calculada a partir da curva de calibração foi de  $157,2 \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$ , cerca de 4 vezes menor que a sensibilidade alcançada para o imunoenensaio não-enzimático ( $7097,1 \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$ ), evidenciando outra diferença desses procedimentos. Em contrapartida, ambos os imunoenseaios apresentaram similaridade nos limites de detecção, com 19 e  $16 \text{ fg mL}^{-1}$  para sistema enzimático e não-enzimático, respectivamente. Esses baixíssimos LDs obtidos sugerem um possível diagnóstico precoce para o cancro cítrico, ou seja, a detecção da doença em plantas ainda em fase assintomática, evitando possíveis epidemias e minimizando maiores prejuízos ao citricultor. A detecção precoce é um grande avanço no ramo de dispositivos para detecção de doenças em cultivares. No mercado temos conhecimento da disponibilidade de um teste sorológico comercial, que consiste num kit contendo uma pequena bolsa plástica com solução tampão e uma fita específica para detecção da bactéria<sup>126</sup>. Neste teste, a amostra é macerada no interior da bolsa com tampão e, em seguida, a fita é parcialmente inserida em contato com a solução. A rapidez e a praticidade operacional desse kit fazem com que essa ferramenta seja de grande utilidade para o diagnóstico do cancro cítrico no campo. Entretanto, devido ao seu alto limite de detecção ( $4 \times 10^4 \text{ células mL}^{-1}$ ) sua função principal é apenas confirmar a doença após o diagnóstico visual. Na literatura também se encontra em desenvolvimento alguns imunoenseaios buscando métodos alternativos para o diagnóstico precoce do cancro cítrico, de forma simples, rápida e de baixo custo<sup>62-64</sup>. No entanto, nenhum desses trabalhos relata limites de detecção tão baixos quanto aos encontrados para os imunoenseaios aqui desenvolvidos, mesmo que sejam para outras proteínas.

#### 4.3.5 - Determinação de TREA em amostras de plantas cítricas

Para estudar a aplicabilidade dos dois imunoenaios desenvolvidos, amostras de plantas infectadas ou não-infectadas pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. foram avaliadas. As amostras de folhas de plantas de laranja (*Citrus sinensis*) foram preparadas de acordo com item 4.2.6 e diluídas na proporção 1:10.000 em PBS (pH 7,4), e as respostas do imunoensaio enzimático e não-enzimático foram obtidas. A priori, estas amostras de cultivares foram diagnosticadas com a doença cancro cítrico pelo método comparativo PCR realizado pela Fundecitrus. Um teste ELISA indireto para quantificação da proteína trealase foi utilizado em nosso grupo, no qual para este imunoensaio, a amostra de interesse foi aplicada diretamente à placa, seguida pela incubação com anticorpos policlonais específicos para proteína TREA e subsequente incubação com o anticorpos anti-imunoglobulinas (anti-IgG) marcados com enzimas HRP. Os resultados são demonstrados na figura 4.12.

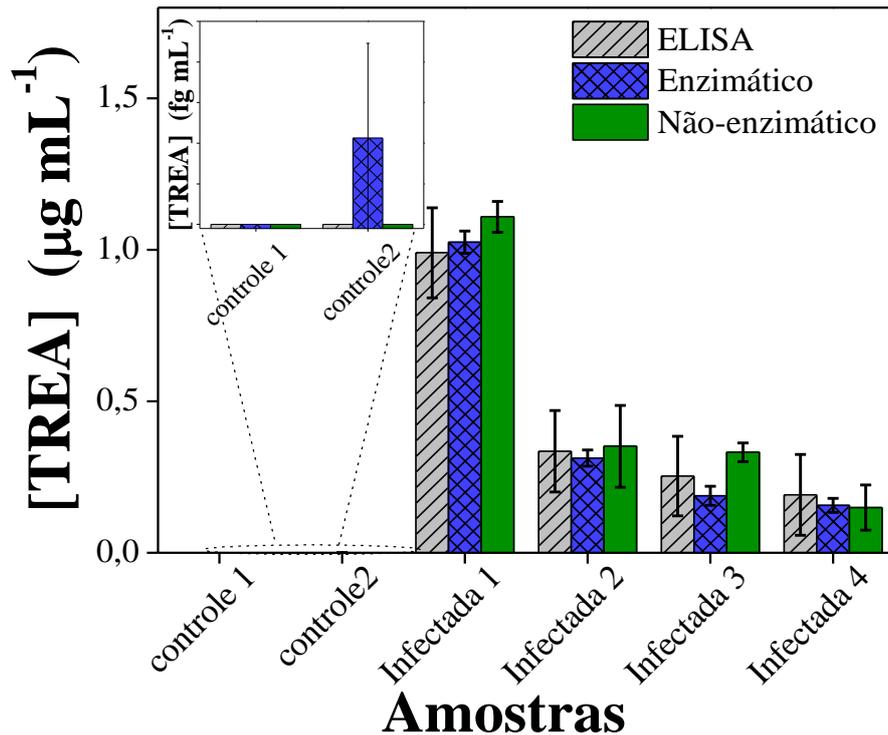


FIGURA 4.12 - Gráfico de barras comparando os resultados obtidos com um imunoenensaio eletroquímico enzimático, não-enzimático e teste Elisa para detecção de TREA em amostras de plantas cítricas.

Como mostrado na figura 4.12, os procedimentos desenvolvidos apresentaram excelente concordância entre as concentrações de TREA nas amostras para os imunoenaios entre si e em relação ao método ELISA. O fato de ambos os sistemas utilizarem NPMs favoreceu a separação da proteína alvo, auxiliou a eliminação de possíveis interferente e, principalmente, minimizou qualquer efeito que a matriz poderia gerar. Esses resultados foram avaliados pelo teste *t* pareado, não havendo diferença significativa entre os métodos ao nível de 95% de intervalo de confiança, uma vez que o imunossensor enzimático apresentou um valor de *t* calculado de 1,04, e o valor para o imunoenensaio não-enzimático foi 1,22, ou seja, valores inferiores ao *t* crítico tabelado (<3,18). Assim, esses resultados sugerem que tanto o imunossensor enzimático quanto o imunoenensaio não-enzimático apresentaram altos níveis de precisão e exatidão, podendo ser utilizados como uma poderosa

ferramenta para o diagnóstico da doença em citros, em especial nos casos assintomáticos.

#### 4.4 - CONCLUSÃO PARCIAL

Na segunda parte deste trabalho, foi realizado um estudo comparativo do desempenho de dois imunossaios eletroquímicos para detecção inédita da trealase (TREA), um potencial biomarcador proteico para a doença cancro cítrico. Assim, os sistemas avaliados envolveram o uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos carboxilas para imobilização covalente de anticorpos policlonais anti-TREA, sendo avaliados um imunossensor enzimático e um imunossenso-magnético não-enzimático. O imunossensor enzimático utilizou enzima HRP como marcador eletroquímico. Em contraste com este sistema, no imunossenso não-enzimático utilizou-se eletrodos sem nenhuma modificação e o marcador eletroquímico empregado foi a nanopartícula de ouro revestida com citrato (AuNP). Em condições otimizadas, amplas faixas lineares foram obtidas de  $25,0 \text{ fg mL}^{-1}$  a  $10 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $1,0 - 62,5 \text{ pg mL}^{-1}$  para o imunossenso enzimático e não-enzimático, respectivamente. Os limites de detecção obtidos foram muito similares para os dois imunossaios, com  $19,0 \text{ fg mL}^{-1}$  para o imunossensor enzimático e  $16,0 \text{ fg mL}^{-1}$  para o imunossenso não-enzimático. Por outro lado, melhor sensibilidade foi alcançada para o imunossenso-magnético não-enzimático ( $7097,1 \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$ ). Os dois sistemas construídos também foram aplicados para amostras de plantas e comparados com o ELISA, não havendo diferença significativa entre os métodos com intervalo de confiança de 95%, o que demonstrou que ambas as estratégias são adequadas para a detecção precoce do TREA.

*Desenvolvimento de um imunossensor para  
determinação multiplexada das proteínas  
CP-CTV e TREA em cultivares de citros usando a  
ALP como marcador eletroquímico*

*Capítulo 5*

## **5 – DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO MULTIPLEXADA DAS PROTEÍNAS CP-CTV E TREA EM CULTIVARES DE CITROS USANDO A ALP COMO MARCADOR ELETROQUÍMICO**

### **5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver um dispositivo microfluídico descartável para detecção multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA, empregando uma configuração do tipo sanduíche, com nanobastões de ouro na superfície do eletrodo para imobilização de anticorpos de captura e partículas magnéticas bioconjugadas com anticorpos policlonais e enzima fosfatase alcalina como marcador eletroquímico do sistema.

### **5.2 - PARTE EXPERIMENTAL**

#### **5.2.1 - Reagentes e materiais**

A enzima fosfatase alcalina (ALP do inglês *alkaline phosphatase*), usada como marcador eletroquímico, e o seu substrato 1-naftil fosfato foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para a síntese dos nanobastões de ouro foram utilizados os reagentes ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ , 99,9%), brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB,  $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), nitrato de prata e ácido ascórbico que também foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O grafeno (tamanho de 2–8  $\mu\text{m}$  e espessura de 3 nm) foi adquirido da Graphene Supermarket (Nova Iorque, EUA). A tinta de carbono da ElectroDag (423SS) foi adquirida da Henkel Corporation (EUA).

Os anticorpos, antígenos e demais reagentes utilizados foram descritos nos capítulos anteriores (item 3.2.1 e 4.2.1).

## 5.2.2 - Instrumentação

Os equipamentos utilizados neste trabalho já foram mencionados nos capítulos anteriores (item 3.2.2 e 4.2.2).

## 5.2.3 - Preparação de soluções e síntese de materiais

### 5.2.3.1 - Síntese dos nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro (AuNRs, do inglês *gold nanorods*) foram sintetizados pelo método mediado por sementes, descrito anteriormente por Yan et al. (2019)<sup>127</sup>. Basicamente, duas etapas são necessárias para formação dos nanobastões a partir deste método. A primeira etapa consiste na obtenção de pequenas partículas de semente de ouro (*seed particles*), e para isso, 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi adicionada a 7,5 mL de CTAB ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em um béquer sob agitação. A essa solução, adicionou-se rapidamente 600  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{NaBH}_4$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) recém preparada em banho de gelo, e essa mistura foi mantida sob agitação (1000 rpm) por 2 minutos. Após esse período, a solução resultante, de coloração amarela acastanhada, foi mantida em repouso durante 2 horas, à temperatura ambiente.

Na segunda etapa, os AuNRs foram obtidos a partir dessas sementes de ouro e de uma solução de crescimento. Para solução de crescimento, 1,7 mL de  $\text{HAuCl}_4$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram adicionados a 40 mL de CTAB ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Após agitação suave, 270  $\mu\text{L}$  do agente redutor ácido ascórbico ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi adicionado lentamente a essa solução. Com este passo, a solução de crescimento

se tornou gradualmente incolor. Em seguida, a formação dos AuNRs foi iniciada após adição de 300  $\mu\text{L}$  da dispersão com as sementes de ouro. A solução de AuNRs resultante foi mantida sob agitação (400rpm) por 30 minutos, obtendo uma coloração roxa azulada. Em seguida, essa solução foi deixada em repouso por 16 horas à temperatura ambiente para o crescimento completo dos nanobastões. Por fim, etapas de lavagens foram realizadas para retirar o excesso de CTAB por centrifugações repetitivas (10.000 rpm, por 10 minutos) e, os AuNRs foram dispersos em 10 mL de água ultrapura, a armazenados a 4 °C.

### 5.2.3.2 - Preparação do rGO-AuNR

O rGO-AuNR foi um dos materiais avaliados para modificação da superfície do eletrodo, e assim, sua preparação será brevemente descrita<sup>128</sup>. Para tal finalidade, 2,0 mL de uma dispersão de óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *reduced graphene oxide*) ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram misturados com 20  $\mu\text{L}$  de polilisina ( $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) por 30 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, o excesso de polilisina foi removido por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Depois disso, foram adicionados 2,0 mL da dispersão de AuNR ao material, rGO/polilisina, e agitados por 5 minutos. O material que não interagiu com o rGO foi removido após o descarte do sobrenadante e lavagens sucessivas com água ultrapura, que foram realizados com auxílio do processo de centrifugação. Finalmente, o precipitado contendo rGO-AuNR foi disperso em 2,0 mL de água ultrapura e armazenado sob refrigeração até sua utilização.

### 5.2.4 - Desenvolvimento do imunossensor multiplexado

O imunossensor eletroquímico para determinação multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA envolveu uso de um sistema microfluídico,

semelhante aos dispositivos expostos anteriormente. Os anticorpos anti-CP-CTV e anti-TREA foram imobilizados na superfície dos 8 eletrodos presentes no arranjo (sendo 4 eletrodos para cada biomarcador), modificados com AuNR. Como sonda de captura para os biomarcadores proteicos, foi utilizado um bioconjugado de partículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais, anti-CP-CTV ou anti-TREA, e enzima ALP. As etapas serão resumidamente mencionadas, e estão representadas na figura 5.1.

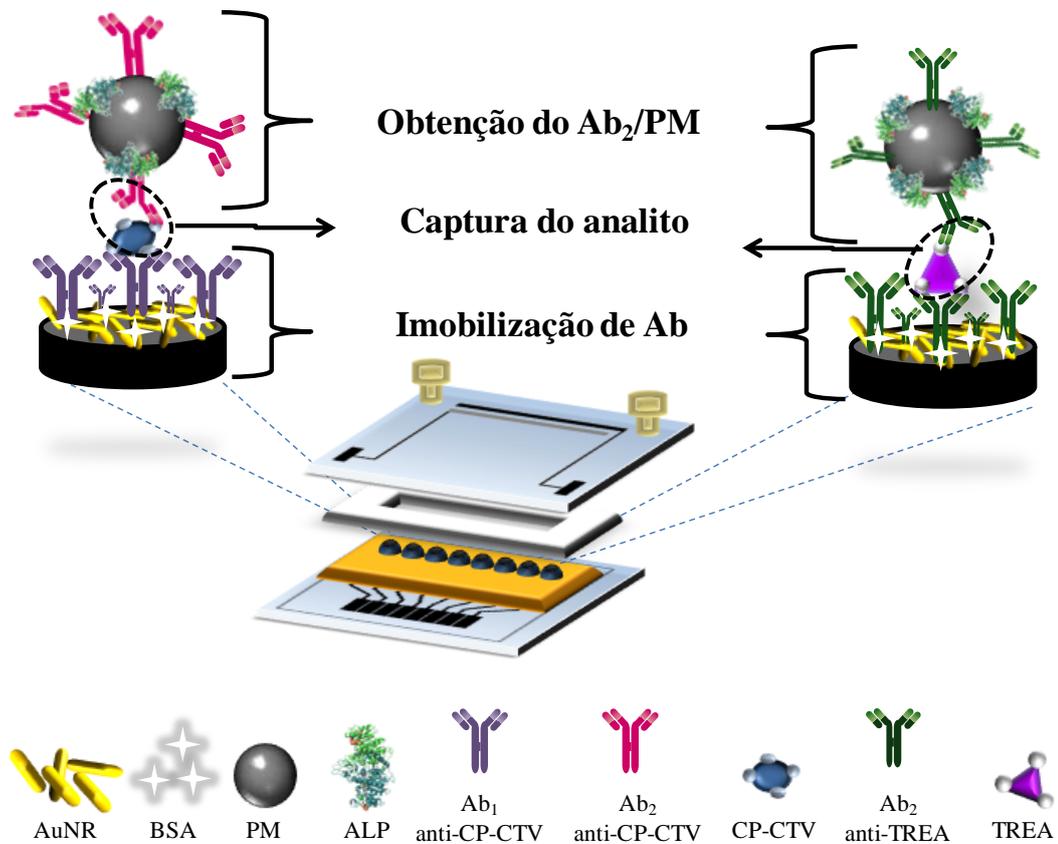


FIGURA 5.1 - Esquema representativo do imunossensor multiplexado para detecção eletroquímica dos biomarcadores CP-CTV e TREA, especificando a etapa de modificação da superfície do eletrodo e imobilização dos anti-CP-CTV (Ab<sub>1</sub>) e anti-TREA (Ab<sub>2</sub>); preparação do bioconjugado contendo partículas magnéticas decoradas com anticorpos policlonais e enzimas ALP; captura dos biomarcadores CP-CTV e TREA usando o bioconjugado e posterior formação do imunossensaio multiplexado do tipo sanduíche.

#### *5.2.4.1 - Imobilização de anti-CP-CTV e anti-TREA no arranjo de eletrodos*

A estratégia utilizada neste método se baseou na modificação do arranjo de eletrodos com nanobastões de ouro. Este material pode ser facilmente funcionalizado com ácidos nucleicos, polímeros anfifílicos e proteínas, por meio das ligações Au-N ou Au-S ou por adsorção física, e assim, sua aplicação em imunossensores tem crescido notoriamente<sup>127,129,130</sup>. Desta forma, os AuNRs foram colocados em banho de ultrassom por 5 minutos para garantir homogeneidade da dispersão. Em seguida, 10 µL desta dispersão foi colocada sobre a superfície do eletrodo serigrafado e deixada secar a temperatura ambiente. Após essa etapa, lavagens com PBS (pH 7,4) foram realizadas para retirar o excesso de AuNR. A configuração usada na preparação do imunossensor multiplexado consistiu em adicionar os anti-CP-CTV (monoclonal) e anti-TREA (policlonal) no mesmo arranjo de eletrodos, resultando em um dispositivo com 4 eletrodos consecutivos para cada biomarcador e com 4 replicadas por análise (figura 5.2). Sendo assim, 10 µL de uma solução contendo anti-CP-CTV (10,0 µg mL<sup>-1</sup>) ou anti-TREA (20,0 µg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados à superfície do eletrodo modificado com AuNR, e mantidos por 18 horas sob refrigeração. Após conjugação destes anticorpos aos AuNRs através da ligação ouro-nitrogênio, os eletrodos foram lavados com PBS (pH 7,4). Logo após, os locais de ligação não-específicos foram bloqueados com BSA (1% (m/v) em PBS) por 1 hora a 4 °C, seguido de lavagem com PBS (pH 7,4). Os eletrodos foram guardados sob refrigeração até seu uso. O esquema com a imobilização dos anticorpos aos eletrodos de trabalho está representado na figura 5.2.

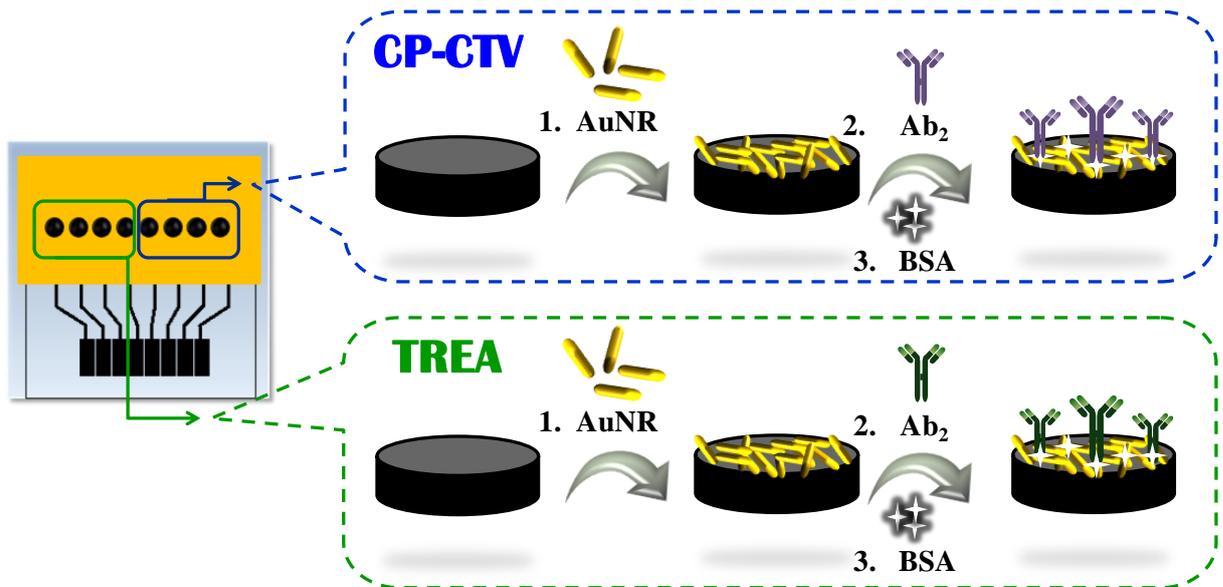


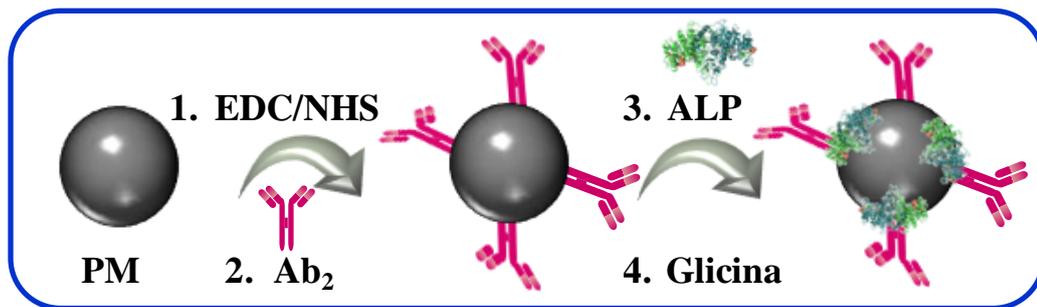
FIGURA 5.2 - Representação da imobilização do anti-CP-CTV e anti-TREA na superfície dos eletrodos de trabalho modificados com nanobastões de ouro.

#### 5.2.4.2 - Preparação dos bioconjugados anti-CP-CTV-PM-ALP e anti-TREA-PM-ALP

A bioconjugação das partículas magnéticas comerciais com anticorpos policlonais e com a fosfatase alcalina foi realizada empregando os protocolos dos trabalhos mencionados anteriormente<sup>82,98,99,101</sup>, com algumas modificações para imobilização da ALP. Resumidamente, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de PM carboxiladas ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  e diâmetro médio de  $1,0 \mu\text{m}$ ) foi transferida para um microtubo de 2,0 mL, e o tampão MES ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,2) foi usado para lavagem com auxílio de um suporte magnético. Os grupos carboxílicos das PMs foram ativados utilizando a solução de EDC/NHS ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , preparada em tampão MES), sob agitação lenta por 30 minutos. Posteriormente, as PMs com carboxilas ativadas foram lavadas 2 vezes com MES, e incubadas por 24 horas com 250  $\mu\text{L}$  dos anticorpos policlonais anti-CP-CTV ( $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou anti-TREA ( $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), preparados neste mesmo tampão. Após a etapa de imobilização do anticopo, as PMs-Ab<sub>2</sub> de cada biomarcador foram lavadas com tampão TRIS ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ,

pH 8,0). Para conjugação da fosfatase alcalina, 800  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo essa enzima ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , condição otimizada) foram incubados com PM-Ab<sub>2</sub> por 18 horas, sob agitação lenta. Os grupos carboxila que não reagiram foram bloqueados utilizando uma 500  $\mu\text{L}$  de solução de glicina ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) por 30 minutos e sob agitação. Por fim, foram necessárias lavagens com tampão TRIS ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,0) para retirar o excesso do bloqueador, e então, cada bioconjugado foi ressuspendido em 400  $\mu\text{L}$  deste mesmo tampão (figura 5.3). O rendimento de cada bioconjugado preparado é de aproximadamente 40 medidas eletroquímicas.

### CP-CTV



### TREA

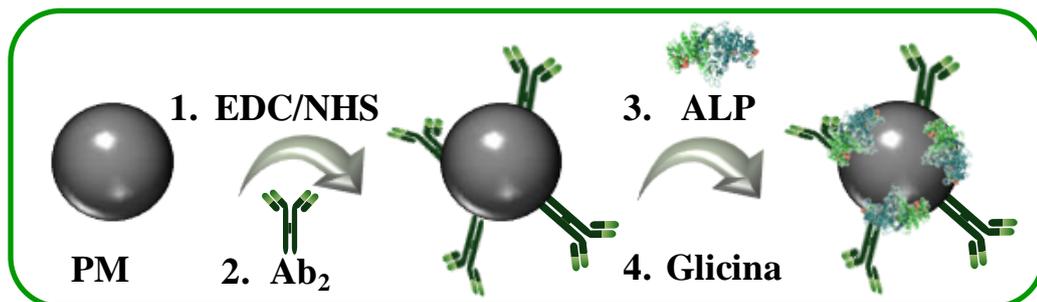


FIGURA 5.3 - Esquema das etapas de imobilização dos anticorpos policlonais específicos para CP-CTV e TREA e também da enzima fosfatase alcalina nas PMs carboxiladas.

### 5.2.4.3 - Formação do imunensaio multiplexado

Para captura simultânea dos biomarcadores, utilizou-se uma solução contendo as proteínas padrão TREA e CP-CTV diluídas em tampão TRIS (20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0) e os bioconjugados, anti-CP-CTV-PM-ALP e anti-TREA-PM-ALP, preparados de acordo com o item 5.2.4.2. Assim, 10 µL de cada bioconjugado foram adicionados a 500 µL da solução mista contendo TREA e CP-CTV, e agitados lentamente por 40 minutos a 37 °C. O material resultante, mistura dos conjugados CP-CTV-Ab<sub>2</sub>-PM-ALP e TREA-Ab<sub>2</sub>-PM-ALP, foi lavado e ressuspendido em 125 µL com tampão TRIS (pH 8,0). As etapas aqui mencionadas estão esquematicamente ilustradas na figura 5.4 A.

Esta estratégia também envolveu o uso do dispositivo microfluídico contendo um arranjo de oito eletrodos de trabalho, buscando maior praticidade e automação nas análises eletroquímicas multiplexadas. Assim, para formação dos imunensaio do tipo sanduíche na superfície do eletrodo (figura 5.4 B), 100 µL dessa suspensão foi injetada no dispositivo microfluídico usando uma válvula cromatográfica de injeção manual. Para garantir o máximo de interação antígeno-anticorpo, o fluxo foi interrompido por 40 minutos (tempo otimizado no capítulo 4), e em seguida, o canal foi lavado com a solução carreadora (tampão TRIS, pH 9,6). Por fim, as determinações simultâneas foram realizadas pelo monitoramento da reação enzimática da ALP com seu substrato 1-naftil fosfato (1-NPP, do inglês *1-naphthylphosphate*). Assim, 100 µL da solução de 1-NPP (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) foi adicionado ao sistema, e essa reação foi monitorada empregando a estratégia de fluxo interrompido (*stopped-flow*) por 5 minutos (tempo otimizado). A DPV foi realizada na faixa de potencial -0,2 a +0,7 V vs. pseudo Ag|AgCl com amplitude de modulação de 50 mV, potencial de *step* de 5 mV e velocidade de varredura de 0,01 V s<sup>-1</sup>. Os parâmetros utilizados para a DPV foram baseados em trabalhos previamente reportados<sup>131-133</sup>.

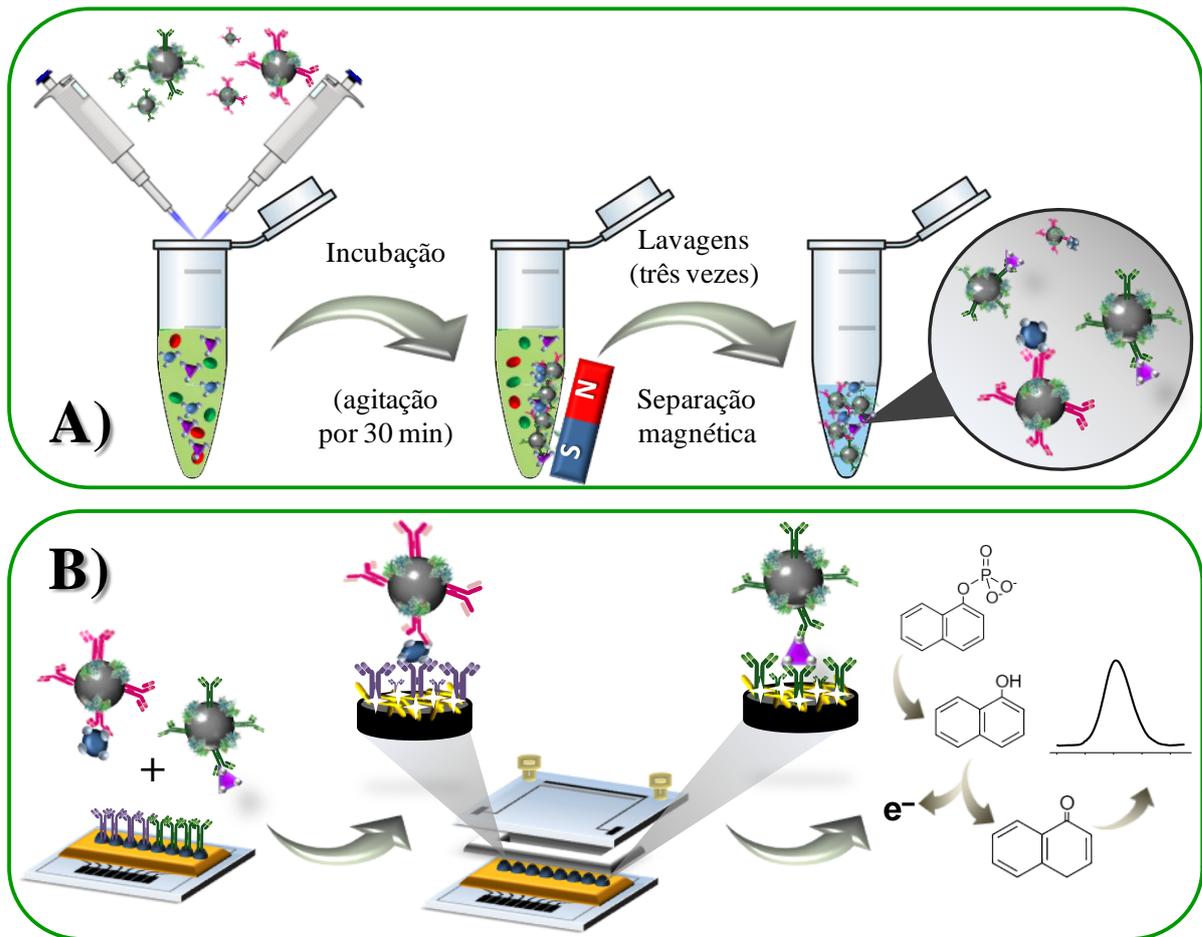


FIGURA 5.4 - A) Representação da etapa de captura das proteínas CP-CTV e TREA após interação com seus respectivos bioconjugados  $Ab_2$ -PM-ALP. B) Formação do imunoenensaio do tipo sanduíche na superfície do eletrodo e o sinal eletroquímico gerado a partir da injeção da solução de detecção contendo 1-NPP.

## 5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 - Estudo do uso de diferentes materiais na superfície do eletrodo

A imobilização de proteínas, seja sonda de DNA, anticorpo ou enzima, na superfície do transdutor é uma etapa necessária e crítica no desenvolvimento de biossensores e, neste sentido, os nanomateriais e seus derivados têm sido uma alternativa para melhorar o desempenho dessas plataformas de detecção<sup>42,134</sup>. Desta forma, a primeira etapa para o desenvolvimento do imunoenensaio multiplexado foi o estudo de diferentes materiais para modificação da superfície eletródica, a fim de proporcionar ao sistema maior quantidade de pontos de ligação de anticorpos de captura, além de também buscar um aumento na condutividade e biocompatibilidade. Para isso, os materiais como óxido de grafeno reduzido, nanobastões de ouro e o nanocompósito rGO-AuNR foram avaliados como modificadores do eletrodo de carbono serigrafado, e a enzima ALP ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi diretamente imobilizada nessa superfície modificada. A viabilidade do material foi avaliada pelo sinal de detecção gerado com base na reação da ALP com seu substrato 1-NPP por DPV. Além disso, análises na ausência da enzima também foram realizadas para cada modificador, a fim de confirmar que apenas o substrato 1-NPP não apresenta pico redox na faixa de potencial estudada. As respostas eletroquímicas estão apresentadas na figura 5.5.

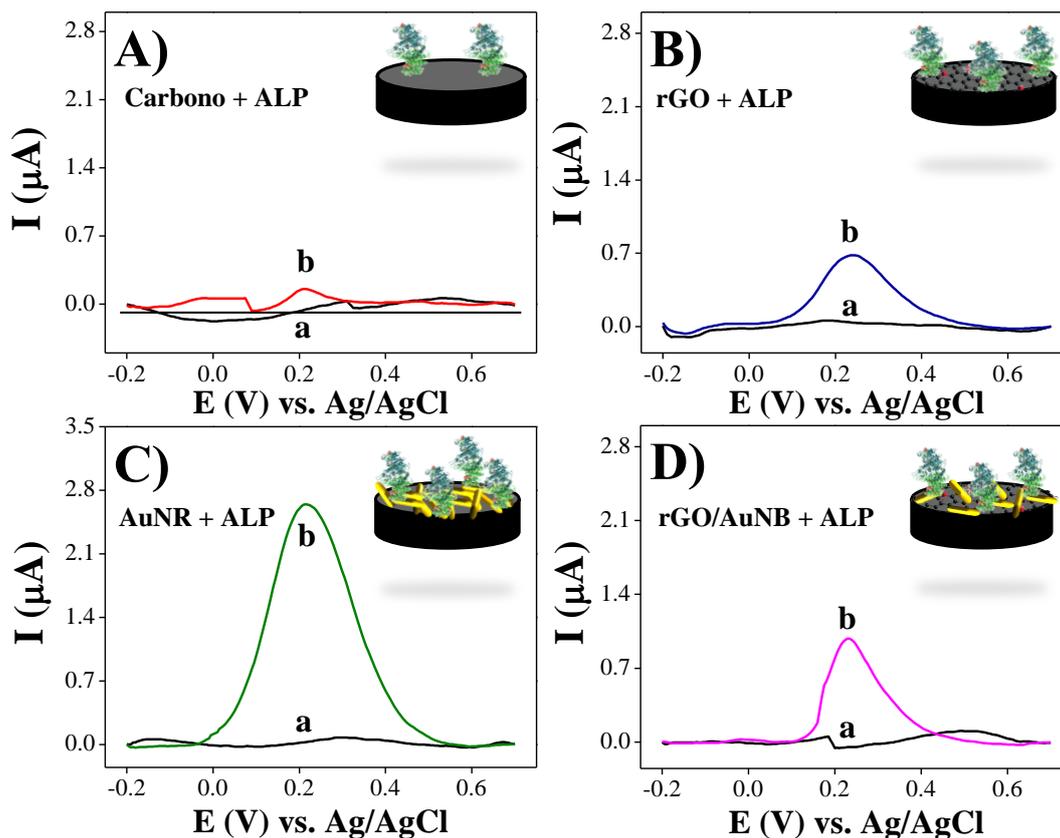


FIGURA 5.5 - Comparação da resposta voltamétrica para oxidação do 1-naftol na (a) ausência e (b) presença da ALP imobilizada na superfície do eletrodo de carbono A) sem modificação e modificado com B) rGO, C) AuNR e D) rGO-AuNR. Condições: [ALP]= 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; [1-NPP]= 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

Como mostrado na figura 5.5, o eletrodo usando o rGO como material modificador (figura 5.5 B) exibiu um pequeno aumento na magnitude de sinal, cerca de 4 vezes maior, que a resposta obtida para o eletrodo de carbono (sem modificação, figura 5.5 A). Esse melhor desempenho pode ser atribuído à presença de um maior número de grupos carboxilas neste material, ocasionando a formação da ligação amida com a ALP, e conseqüentemente, aumentando a quantidade de enzimas imobilizadas no eletrodo. Na figura 5.5 C, a corrente de oxidação do substrato aumentou significativamente quando os AuNRs foram utilizados (resposta cerca de 17 vezes maior). Isso pode ser atribuído à alta área superficial dos AuNRs, oferecendo condições favoráveis para imobilização de proteínas em sua superfície. Além disso, os AuNRs

possuem excelente condutividade elétrica, contribuindo para uma transferência de elétrons mais eficiente, o que leva a um aumento no sinal eletroquímico para a oxidação do 1-naftol. Da mesma forma, verificou-se o desempenho do compósito rGO-AuNR (figura 5.5 D). Esse material foi utilizado a fim de melhorar ainda mais as propriedades dos precursores, aumentando os locais de ligação devido à alta relação área/superfície/volume e aprimorando a condutividade superficial<sup>128</sup>. Diferente do que era esperado, o material apresentou um aumento na resposta eletroquímica apenas 7 vezes maior que o sinal do eletrodo não modificado, indicando, principalmente, que poucas moléculas de ALP podem ter sido imobilizadas na superfície ou ainda, que podem ter levado a uma orientação preferencial da ALP, tornando seu centro ativo não acessível.

O estudo de velocidade de varredura também foi realizado para estes materiais a fim de avaliar a área aparente eletroquimicamente ativa dos eletrodos após as diferentes modificações. Neste estudo, a voltametria cíclica foi realizada usando o ácido ferroceno monocarboxílico ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl) como sonda eletroquímica, no intervalo de potencial de 0,0 a 0,6 V vs. Ag|AgCl e variando a velocidade de varredura de 50 a  $400 \text{ mV s}^{-1}$  (figura 5.6). Aqui, a área aparente eletroativa também foi estimada usando a equação de Randles-Sevcik ( $I_p = \pm (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$ ), e os valores de cada componente do sistema estão descritos no item 3.3.1. Como pode ser visto, o eletrodo de carbono sem modificação (figura 5.6 (A)) apresentou os picos de oxidação e redução característicos para ácido ferroceno monocarboxílico, e sua área eletroativa calculada foi de  $3,42 \text{ mm}^2$ . Após adição do rGO (figura 5.6 (B)), um aumento de aproximadamente 35% foi obtido, apresentando uma área aparente eletroquimicamente ativa de  $3,92 \text{ mm}^2$ . As figuras 5.6 (C) e (D) mostram o estudo de velocidade para o eletrodo modificado com o AuNR e com o compósito rGO-AuNR, e como esperado, um aumento considerável foi atingindo para esses dois materiais, resultando em uma área de  $5,22 \text{ mm}^2$  e

5,13 mm<sup>2</sup>, respectivamente. O incremento para estes dois materiais foi superior a 50% em relação à área aparente eletroativa do eletrodo sem modificação. Isso indica que a melhora na condutividade pode estar relacionada ao aumento da área condutora, uma vez que materiais poliméricos isolantes, que estão presentes na tinta de carbono, são recobertos pelo material modificador. Esses resultados apresentaram concordância com os obtidos anteriormente por DPV. Considerando o que foi exposto, os AuNRs foram escolhidos para o desenvolvimento do imunossensor multiplexado, uma vez que este modificador apresentou melhores condições tanto para imobilização de proteínas, quanto em relação à área aparente eletroativa. Os valores de área calculada e o aumento relacionado ao eletrodo sem modificador estão apresentados na tabela 5.1.

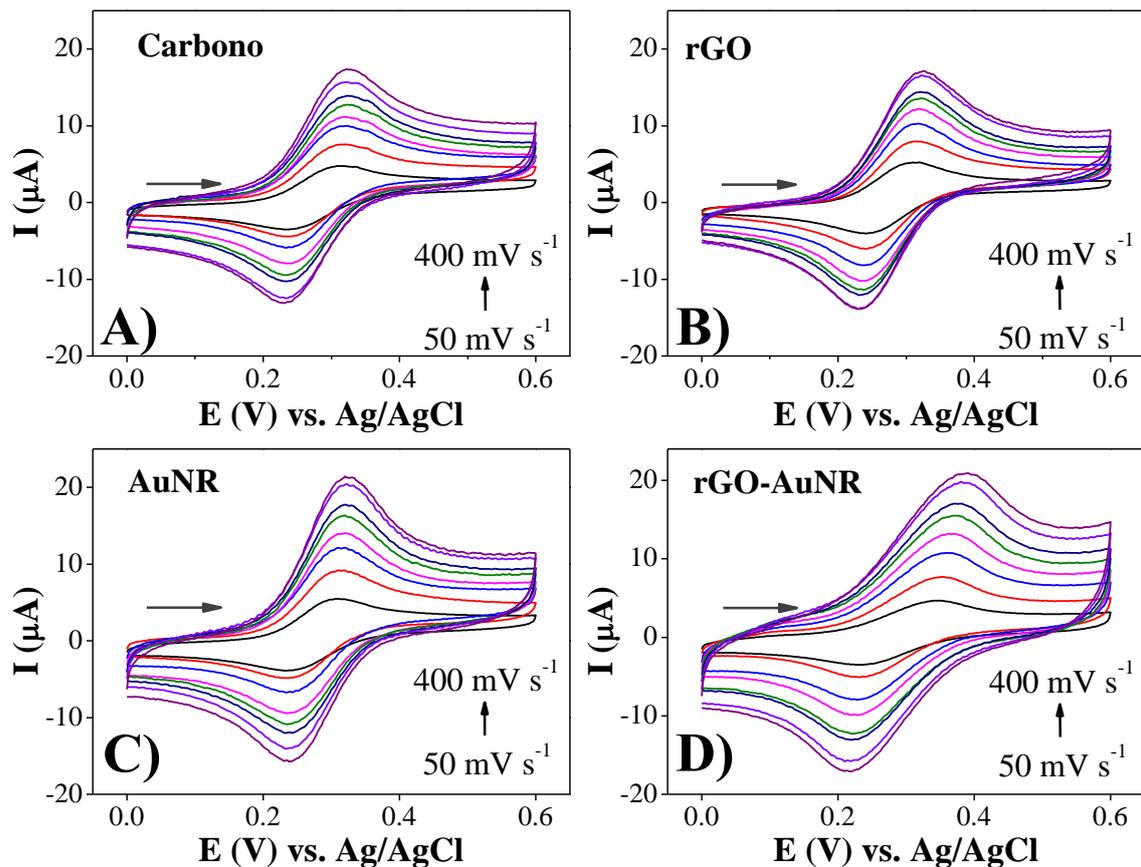


FIGURA 5.6 - Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (de 50 a 400 mV s<sup>-1</sup>) para o eletrodo de carbono A) sem modificação, modificado com

B) óxido de grafeno reduzido, C) AuNR e D) rGO/AuNR, usando 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ferroceno monocarboxílico em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl.

TABELA 0.1 - Comparação das áreas eletroquimicamente ativas para os eletrodos sem modificação (carbono) e modificados com rGO, AuNR e rGO/AuNR obtidos a partir dos voltamogramas da figura 5.6.

Materiais	Área (mm <sup>2</sup> )	Aumento da área* %
Carbono	3,42	-
rGO	3,92	14,5
AuNR	5,22	52,7
rGO-AuNR	5,13	50,2

\*aumento percentual da área eletroativa aparente comparado ao não modificado.

### 5.3.2 - Caracterização dos eletrodos de carbono modificados com AuNRs

Uma vez definido o melhor modificador, outro estudo realizado foi a caracterização da superfície eletródica modificada com nanobastões de ouro. Primeiramente, a obtenção dos AuNRs foi confirmada por UV-Vis, em que foram observadas as bandas características de ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*) desse nanomaterial. Assim, os espectros de absorção do UV-Vis para os nanobastões exibiram duas bandas de SPR em 530 e 665 nm, que correspondem aos modos de oscilação transversal e longitudinal dos AuNRs, respectivamente<sup>135,136</sup>. Em seguida, imagens de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para caracterizar o eletrodo de carbono sem modificação e com AuNRs (figura 5.7), nas quais observa-se uma superfície com morfologia rugosa característica de tintas de carbono. Essa superfície irregular pode fornecer uma grande área de

superfície e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de material a ser depositado<sup>137</sup>. No entanto, a partir das análises de MEV pouca diferença morfológica entre a superfície modificada e sem modificação foi observada e, desta forma, um mapeamento por EDX foi realizado, a fim de avaliar a composição química dessas superfícies. Na figura 5.7 (A), pode-se observar que o eletrodo sem modificação é composto pelos elementos C e Cl, provenientes da tinta de carbono Electrodag. Com a deposição de nanobastões de ouro na superfície deste eletrodo de trabalho (figura 5.7 (B)), pode ser observado uma distribuição homogênea do ouro por toda superfície, indicando a eficácia na etapa de modificação do eletrodo.

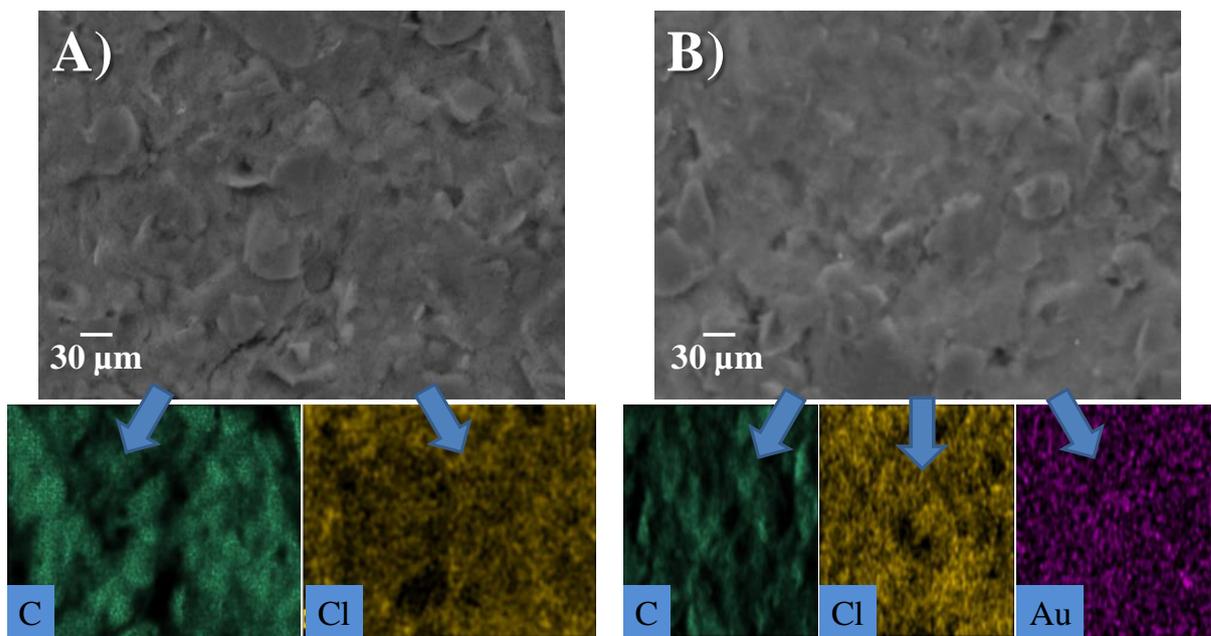


FIGURA 5.7 - Imagens de MEV para eletrodo de carbono A) sem modificação e B) modificado com nanobastões de ouro, e os mapas de cores em quantidades de C, Cl e Au por EDS.

### 5.3.3 - Otimização dos parâmetros experimentais

A estratégia utilizada neste dispositivo envolveu também o uso de partículas magnéticas para imobilização de anticorpos policlonais e da enzima

ALP. Esta enzima tem sido amplamente utilizada em imunossaios como marcador eletroquímico devido à alta estabilidade, à ampla especificidade ao seu substrato, ao baixo custo e por possuir reações com baixos níveis de interferências<sup>52,138</sup>. Além disso, a ALP fornece maior praticidade na configuração do sistema em relação aos imunossaios que utilizam a enzima HRP, uma vez que não há necessidade de remoção do oxigênio dissolvido nas soluções de detecção. Para a otimização das variáveis experimentais imunossai multiplexado das proteínas CP-CTV e TREA, apenas as condições relacionadas ao uso da enzima ALP foram realizadas, visto que nos itens 3.3.3 e 4.3.3 estão apresentadas algumas condições ótimas para interação antígeno-anticorpo dessas proteínas individualmente. O princípio de detecção desta estratégia baseou-se na reação catalítica da fosfatase alcalina com seu substrato 1-naftil fosfato, representada na figura 5.8. Inicialmente, o substrato 1-naftil fosfato é hidrolisado pela ALP, gerando os produtos 1-naftol e fosfato inorgânico (etapa 1). Em seguida, a técnica de voltametria de pulso diferencial foi aplicada, resultando em um sinal analítico devido à oxidação do 1-naftol na superfície do eletrodo, com o potencial de pico em +0,22 V (etapa 2).

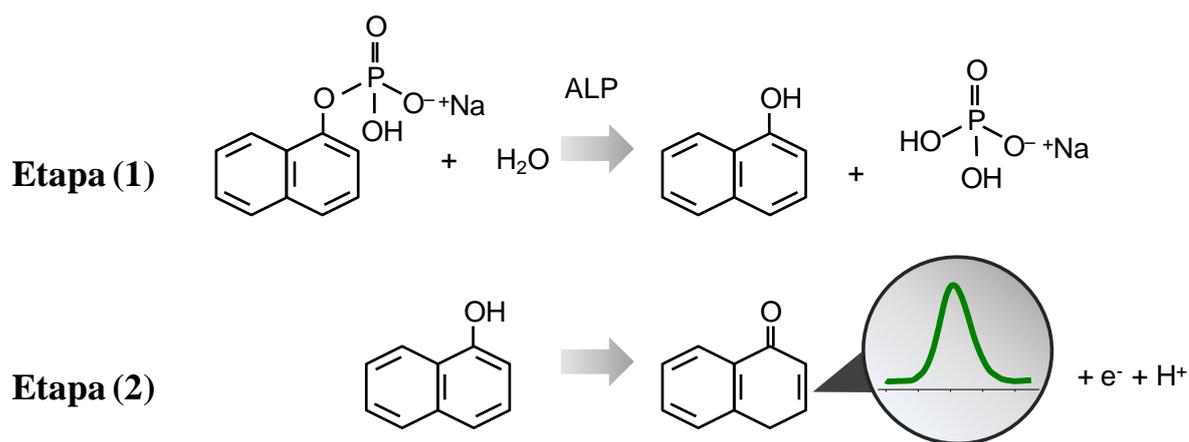


FIGURA 5.8 - Esquema da reação catalítica da fosfatase alcalina com seu substrato 1-naftil fosfato e etapa de oxidação eletroquímica do produto formado.

Os parâmetros experimentais foram avaliados, inicialmente, apenas para proteína TREA de forma a obter melhor desempenho analítico do sistema, e posteriormente, foram aplicados para os dois biomarcadores. Assim, foi estudada a concentração da enzima imobilizada na superfície da partícula magnética; a concentração do substrato 1-NPP e o tempo para formação do 1-naftol. Neste estudo, o critério utilizado para escolha de cada parâmetro estudado foi a razão entre a corrente de pico medida por DPV para proteína TREA (S) e o controle (branco) (C). Os resultados obtidos são mostrados na figura 5.9.

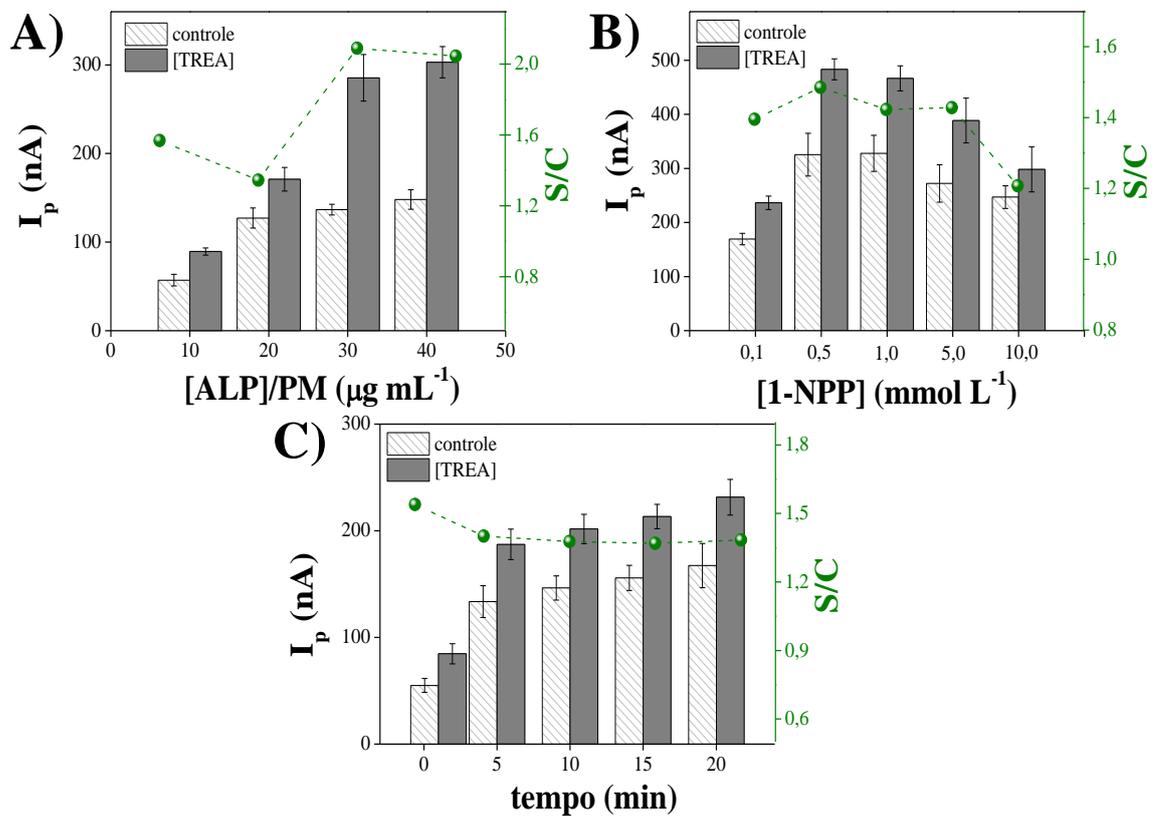


FIGURA 5.9 - Parâmetros avaliados: A) influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizadas nas partículas magnéticas; B) concentração de substrato 1-NPP e C) estudo do tempo de formação do 1-naftol nas respostas de DPV para o imunossensor do tipo sanduíche para TREA. Condições:  $[\text{TREA}] = 12,5 \text{ pg mL}^{-1}$ ,  $[\text{Ab}_2]_{\text{eletrodo}} = 20,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $[\text{Ab}_2]_{\text{PM}} = 10,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , usando tampão TRIS (pH 9,6) como solução carreadora.

Primeiramente, a quantidade de enzima fosfatase alcalina foi avaliada por meio do preparo do bioconjugado Ab<sub>2</sub>-PM-ALP, usando soluções contendo entre 10 e 40 µg mL<sup>-1</sup> da enzima (figura 5.9 A). Após essa bioconjugação, a proteína TREA (pg mL<sup>-1</sup>) foi capturada pelo bioconjugado e, posteriormente, incubadas no arranjo de eletrodos modificados com anticorpo, conforme descrito no item 5.2.4.3. Após formação do imunoenensaio do tipo sanduíche, uma solução de 1-NPP (5,0 mmol L<sup>-1</sup>) foi adicionada ao dispositivo microfluídico e, em seguida, o fluxo foi interrompido para que a reação de hidrólise do substrato ocorresse. Para esta análise, o tempo para reação enzimática e formação do 1-naftol foi de 10 minutos e a técnica de voltametria de pulso diferencial foi aplicada na faixa de -0,2 a +0,7 V vs. pseudo Ag|AgCl. Como pode ser observado na figura 5.9 A, um incremento na corrente de pico de oxidação do 1-naftol, tanto para TREA quanto para o branco, foi alcançado com o aumento da concentração de ALP no bioconjugados. No entanto, os valores de correntes para as concentrações de 30 e 40 µg mL<sup>-1</sup> apresentaram resultados similares, indicando uma possível saturação. Assim, a concentração escolhida para imobilização das ALPs nas Ab<sub>2</sub>-PMs foi de 30 µg mL<sup>-1</sup>. Outro parâmetro avaliado foi a concentração do substrato 1-naftil fosfato, variando a concentração da solução entre 0,1 e 10 mmol L<sup>-1</sup>. A figura 5.9 B apresenta os resultados para este estudo, no qual os valores de corrente de pico aumentaram com a concentração de substrato até 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, ocorrendo uma diminuição gradual para maiores concentrações. Este fato pode estar relacionado à incrustação no eletrodo devido à eletropolimerização do produto da reação electroquímica<sup>139</sup>. Assim, a concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de 1-NPP foi selecionada para as análises subsequentes, uma vez que apresentou maior sinal analítico e uma maior razão sinal do analito/branco. Por fim, também foi avaliado o tempo para hidrólise do 1-NPP, catalisada pela ALP, variando o período de tempo em até 20 minutos (figura 5.9 C). Para escolha deste parâmetro, o perfil voltamétrico do pico de oxidação do 1-naftol também foi levado em consideração.

Assim, 5 minutos foi o tempo escolhido para os imunoenaios posteriores, pois apresentou boa definição do pico de oxidação e uma boa razão sinal do analito/branco.

### 5.3.4 - Desempenho analítico do imunossensor multiplexado

Abordagens que realizam o diagnóstico de várias doenças simultaneamente (multiplexação) são recursos necessários na área clínica, alimentar e ambiental, pois reduzem o volume de amostras e reagentes, a quantidade e o tempo de análises a serem realizadas, e, conseqüentemente, o custo do produto<sup>140</sup>. Deste modo, o imunoenasão utilizando um arranjo de eletrodos conjugados com anticorpos de captura e partículas magnéticas decoradas com Ab<sub>2</sub> e ALP foi aplicado para determinação multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA sob as condições de trabalho otimizadas. As figuras 5.10 A e B apresentam as curvas analíticas construídas a partir da corrente de pico de oxidação do 1-naftol e o logaritmo da concentração de cada biomarcador. Os desvios padrão foram obtidos a partir de  $n = 4$ , uma vez que cada dispositivo microfluídico permite realizar 4 medições para cada proteína, sendo que cada concentração da curva analítica foi analisada utilizando um novo dispositivo descartável.

A faixa linear para detecção da CP-CTV se estendeu entre 0,3 e 5,1  $\text{pg mL}^{-1}$  da proteína, apresentando uma excelente linearidade ( $R^2 = 0,996$ ) e ajustando-se à equação  $I_p \text{ (nA)} = 9,27 \times 10^{-7} + 7,19 \times 10^{-8} \log [\text{CP-CTV}]$  ( $\text{pg mL}^{-1}$ ), como mostra a figura 5.10 A. Simultaneamente, a curva analítica foi construída para a proteína trealase (figura 5.10 B), apresentando uma faixa linear entre 0,8 e 12,5  $\text{pg mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0,989$ ), com a equação  $I_p \text{ (nA)} = 1,21 \times 10^{-6} + 9,99 \times 10^{-8} \log [\text{TREA}]$  ( $\text{pg mL}^{-1}$ ). Os limites de detecção alcançados foram de 0,1  $\text{pg mL}^{-1}$  (CP-CTV) e 0,6  $\text{pg mL}^{-1}$  (TREA), nos quais foram calculados segundo método IUPAC ( $(3s)/b$ , onde  $s$  foi o desvio

padrão expresso para as medidas de corrente do branco (n = 10) e b é a inclinação da curva analítica).

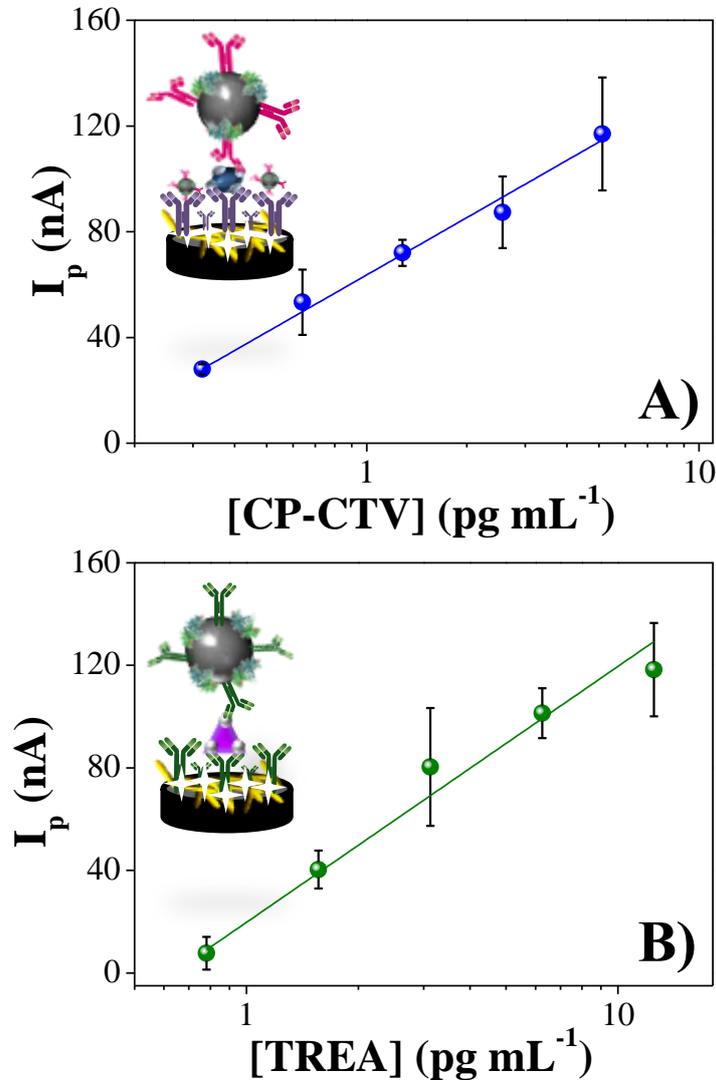


FIGURA 5.10 - Curva de calibração para A) CP-CTV e B) TREA obtidos com o imunossensor multiplexado a partir da resposta eletroquímica da reação de hidrólise do 1-naftil fosfato catalisada pela ALP ( $I$  (nA) x  $\log$  [proteína]).

Embora o imunoenensaio magnético multiplexado tenha apresentado maiores limites de detecção comparados aos outros imunoenensaio desenvolvidos neste trabalho, a magnitude do LD alcançado ainda é extremamente baixa e adequada para detecção dessas doenças, uma vez que não há um valor de corte para estes biomarcadores em amostras de plantas infectadas. Além disso, ainda

não há na literatura o desenvolvimento de dispositivos analíticos para detecção multiplexada dessas doenças cítricas, mostrando o grande potencial deste dispositivo. O imunoenensaio também apresentou alta sensibilidade, boa repetitividade (com de DPR de 4,5% e 5,3% para CP-CTV e TREA, respectivamente). Além disso, a miniaturização de sistema permite sua aplicação em análises de amostras reais visando o diagnóstico da doença Tristeza dos citros e do cancro cítrico em campo. Finalmente, a capacidade de análise deste dispositivo também pode ser aprimorada para a detecção multiplexada de outros biomarcadores para uma única doença, aumentando a exatidão do diagnóstico.

#### **5.4 - CONCLUSÃO PARCIAL**

Neste terceiro trabalho, descrevemos o uso de um imunossensor do tipo sanduíche para detecção multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA, visando o diagnóstico das doenças Tristeza dos citros e cancro cítrico, respectivamente. No procedimento proposto, os AuNRs atuaram como substrato para imobilizar anticorpos de captura na superfície do eletrodo serigrafado, proporcionando alta área superficial, boa condutividade e biocompatibilidade com os biocompostos utilizados. Juntamente a isso, a enzima ALP foi utilizada como marcador eletroquímico, buscando baixo custo e maior praticidade na configuração do sistema em relação a outros imunoenaios enzimáticos. Em condições otimizadas, o dispositivo proposto obteve boas figuras de mérito, apresentando boa resposta linear em uma ampla faixa de trabalho, baixos limites de detecção ( $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $0,6 \text{ pg mL}^{-1}$  para CP-CTV e TREA, respectivamente) e boa repetitividade. Deste modo, acreditamos que o imunossensor multiplexado desenvolvido oferece ótimas condições para detecção de ambos os biomarcadores em amostras reais visando o diagnóstico dessas doenças cítricas, empregando instrumentação eletroquímica portátil e econômica.

# ***CONCLUSÕES FINAIS***

## ***Capítulo 6***

## 6 - CONCLUSÕES FINAIS

Os trabalhos aqui propostos buscaram o desenvolvimento de dispositivos descartáveis voltados para a determinação eletroquímica de doenças associadas às culturas cítricas, a fim obter alta sensibilidade, baixo custo e portabilidade. Além disso, um dos principais enfoques para estes dispositivos foi a busca por baixos limites de detecção, na ordem de  $10^{-15}$  g mL<sup>-1</sup>, que podem oferecer um diagnóstico precoce, se possível em fase assintomática, visando um combate às doenças de forma mais eficaz e com menor custo aos produtores. Em relação à seletividade, todos os procedimentos utilizaram partículas magnéticas decoradas com elementos de biorreconhecimento específicos para cada proteína, que exploraram a imunocaptura magnética e foram capazes de capturar, pré-concentrar e separar os biomarcadores com eficiência e praticidade, o que eliminou os potenciais interferentes.

Na primeira abordagem, um imunoarranjo microfluídico para diagnóstico do *Citrus tristeza vírus* foi desenvolvido. O sistema apresentou elevada precisão e alta sensibilidade, alcançando o menor limite de detecção já relatado na literatura até o momento ( $0,3$  fg mL<sup>-1</sup>). Após uma série de otimizações, o procedimento foi aplicado com sucesso para a determinação do CP-CTV em cultivares de cítricos, sendo os resultados obtidos estatisticamente comparáveis aos do método de referência baseado no teste ELISA. Além disso, o baixo custo na confecção do imunossensor também foi um grande atrativo para esta estratégia, no qual o valor estimado foi de aproximadamente R\$ 1,00 por eletrodo, em comparação com o ensaio ELISA, usado no estudo comparativo, que foi de cerca de R\$ 30,00 por micropoço.

Na segunda abordagem, foi avaliado o potencial da proteína Trealase como possível biomarcador para diagnóstico do cancro cítrico, e assim dois imunoenaios (um enzimático e outro não enzimático) foram desenvolvidos. O imunoensaio enzimático também se baseou no uso da HRP

como marcador eletroquímico, enquanto o não-enzimático empregou as AuNPs para obtenção da resposta eletroquímica. Comparativamente, as performances eletroquímicas de ambos os eletrodos foram similares, com limites de detecção na ordem de  $10^{-15}$  g mL<sup>-1</sup>. Entretanto, o imunossensor enzimático apresentou uma maior faixa linear de trabalho, enquanto o não enzimático apresentou uma maior sensibilidade (*ca.* 4 vezes). A aplicação bem-sucedida de ambas as estratégias foi demonstrada para a determinação da TREA em amostras de plantas cítricas, sendo concordantes com o método ELISA. Além disso, a rapidez no tempo de análise destes dispositivos é outra vantagem, uma vez que as análises levam cerca de 1 hora, considerando a etapa de captura, formação do sanduíche e medida eletroquímica.

A terceira e última abordagem apresentou um imunossensor do tipo sanduíche para detecção multiplexada das proteínas CP-CTV e TREA em plantas cítricas. O sistema microfluídico foi montado com 8 (oito) eletrodos, sendo 4 (quatro) para cada proteína. O processo eletroquímico foi baseado na reação de oxidação do 1-naftol, gerado a partir da hidrólise do 1-naftilfosfato com a fosfatase alcalina. Em condições otimizadas, uma ampla faixa de trabalho foi obtida e os limites de detecção foram estimados em 0,1 pg mL<sup>-1</sup> e 0,6 pg mL<sup>-1</sup> para CP-CTV e TREA, respectivamente. Este sensor apresentou boa resposta analítica e mostrou-se promissor para aplicação em amostras de citrus, tendo em vista que o diagnóstico multiplexado dessas doenças cítricas fornece várias vantagens, tanto do ponto de vista analítico quanto econômico.

Ressaltamos ainda que os procedimentos aqui propostos foram desenvolvidos com instrumentação de baixo custo, majoritariamente constituída de materiais de escritório como, vinil adesivo, folha de transparência, cartão dupla-face e outros. O custo por confecção dos eletrodos, incluindo a modificação química e imunológica, apresentou cerca de 30 vezes menos que um método de ELISA adquirido no Brasil, o que torna a estratégia potencialmente comercializável, tendo em vista que são descartáveis e de fácil

manipulação. Além disso, seu formato e estabilidade são favoráveis para trabalho em condições de campo e transporte para longas distâncias.

Finalmente, as vantagens já mencionadas (baixo custo, fácil portabilidade, bem como a alta sensibilidade e seletividade), indicam que os dispositivos desenvolvidos neste trabalho podem ser uma alternativa aos protocolos ouro (*e.g.*, ELISA e PCR), que são reconhecidamente morosos, caros e que requerem condições laboratoriais.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

***Capítulo 7***

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). "Citrus: World Markets and Trade". Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (Acessado em: 02 de Fevereiro de 2019).
2. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). "Pesquisa de estimativa de safra (PES)- reestimativa da safra de laranja 2019/20 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – cenário em setembro/2019. Disponível em: [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/0919\\_Reestimativa\\_da\\_safra\\_de\\_laranja2.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0919_Reestimativa_da_safra_de_laranja2.pdf) (Acessado em: 10 de Novembro de 2019).
3. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). "Relatório de atividades - jun/2018 - mai/2019". Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2019.pdf>. (Acessado em: 10 de Novembro de 2019).
4. NEVES, M. F. *et al.* "O retrato da citricultura brasileira". *MarkEstrat*, **138**, 2010.
5. National Research Council 2010. Strategic planning for the Florida citrus industry: Addressing citrus greening disease. The National Academies Press, Washington, DC, 2010: p. 17–66 (Chapter 2).
6. MORENO, P., AMBRÓS, S., ALBIACH-MARTÍ, M. R., GUERRI, J. & PEÑA, L. "*Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry". *Mol. Plant Pathol.*, 9 (2): 251, 2008.
7. DAWSON, W. O., BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S. M. & MORENO, P. "*Citrus tristeza virus*: Making an ally from an enemy". *Annu. Rev. Phytopathol.* 53 (1): 137, 2015.
8. NAQVI, S. A. M. H. *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*, Springer, 2004.
9. MEISSNER FILHO, P. E., SOARES FILHO, W. D. S., VELAME, K. V. C., DIAMANTINO, E. P. & DIAMANTINO, M. S. A. S. "Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*". *Fitopatol. Bras.* 27 (3): 312, 2002.
10. TATINENI, S. & DAWSON, W. O. "Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*". *J. Virol.* 86 (15): 7850, 2012.
11. BORDIGNON, R., PENNA, H., FILHO, M. & MULLER, G. W. "Melhoramento genético vegetal". *Bragantia*, 62 (3): 345, 2003.
12. FOLIMONOVA, S. Y. "Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*". *Front. Microbiol.* **4**: 1, 2013.

13. OLIVEIRA, R. P., UENO, B., SCIVITTARO, W. B., KOLLER, O. C. & ROCHA, P. S. G. DA R. "Cancro cítrico: epidemiologia e controle". Embrapa Clima Temperado, **1**: 25, 2008.
14. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). "Cancro Cítrico". Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. (Acessado em: 20 de Outubro de 2019).
15. BEHLAU, F. & BELASQUE JR., J. "Cancro cítrico: a doença e seu controle". Fundecitrus, 2014.
16. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). "Cancro cítrico cresce 28% e CVC segue sob controle no parque citrícola de SP e MG." Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cancro-citrico-cresce-28-e-cvc-segue-sob-controle-no-parque-citricola-de-sp-e-mg/828>. (Acessado: 20 de Outubro de 2019)
17. SÃO PAULO. Imprensa Oficial. Legislação do Estado de São Paulo. Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 10, de 20 de fevereiro de 2017. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. Disponível em: <http://www.imesp.com.br/#> (Acessado em: 10 de outubro de 2019).
18. NETO, E. F., LOPES, M. P. C., PALHARIN, L. H. D. C. & SAMBUGARO, R. "Revisão literária sobre cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)". Rev. Científica Eletônica Agron., **5** (10), 2006.
19. AMARAL, A. M. "Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo". Embrapa Recur. Genéticos e Biotecnol. **1**: 1, 2003.
20. KORKMAZ, S., CEVIK, B., ONDER, S., KOC, K. & BOZAN, O. "Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) from Satsuma Owari mandarins (*Citrus unshiu*) by direct tissue blot immunoassay (DTBIA), DAS-ELISA, and biological indexing". New Zeal. J. Crop Hortic. Sci. **36** (4): 239, 2008.
21. GHORBEL, R., NAVARRO, L. & DURAN-VILA, N. "Biological characterization of citrus tristeza virus isolates by in vitro tissue cultures by in vitro tissue cultures". Plant Pathol. **47** (3): 333, 1998.
22. SAPONARI, M., MANJUNATH, K. & YOKOMI, R. K. "Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®)". J. Virol. Methods, **147**: 43, 2008.
23. ROY, A., ANANTHAKRISHNAN, G., HARTUNG, J. S. & BRLANSKY, R. H. "Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates". Phytopathology, **100** (10):

- 1077, 2010.
24. ZHAO, Y., XIA, Q., YIN, Y. & WANG, Z. "Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri*". PLoS One 11 (7): e0159004, 2016.
  25. GOLMOHAMMADI, M. *et al.* "Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods". J. Appl. Microbiol. 103 (6): 2309, 2007.
  26. TERRADA, E. *et al.* "Fully "Recombinant Enzyme-Linked Immunosorbent Assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of Citrus tristeza virus". Phytopathology, 90 (12): 1337, 2000.
  27. JIN, K.-S. *et al.* "Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on citrus fruits Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay". Plant Pathol. J., 17 (1): 62, 2001.
  28. SONGWATTANA, P. & KUTUDAT-CAIRNS, M. "Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)". Mol. Pathog., 2 (3): 18, 2011.
  29. SOUZA, A. A. DE, TARGON, M. L. P. N., SANTOS, F. A. DOS, MÜLLER, G. W. & MACHADO, M. A. "Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros". Laranja, Cordeiróp., 22 (2): 503, 2001.
  30. QUINTERO-RONDEROS, P., ARANGO, M.-T., CASTIBLANCO, J., CORREA, N. E. & MONTOYA-ORTÍZ., G. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. (eds. Anaya, J.-M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A. & Cervera, R.), El Rosario, 2018.
  31. SAKAMOTO, S., PUTALUN, W., VIMOLMANGKANG, S. & PHOOLCHAROEN, W. "Enzyme - linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites". J. Nat. Med., 72 (1): 32, 2018.
  32. GAN, S. D., PATEL, K. R. & ELISA, S. "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay". J. Invest. Dermatol., 133 (9): 1, 2013.
  33. JEONG, J., JU, H. & NOH, J. "A Review of detection methods for the plant viruses". Res. Plant Dis., 20 (3): 173, 2014.
  34. FANG, Y. & RAMASAMY, R. P. "Current and prospective methods for plant disease detection". Biosensors, 5(3): 537, 2015.
  35. KHATER, M., ESCOSURA-MUÑIZ, A. DE & MERKOÇI, A. "Biosensors for plant pathogen detection". Biosens. Bioelectron., **93**: 72, 2017.

36. DZIĄBOWSKA, K., CZACZYK, E. & DZIĄBOWSKA, K. Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens- A Prospective Way for Rapid Analysis, 2018.
37. MAYEUX, R. "Biomarkers: Potential Uses and Limitations". *NeuroRx.*, 1 (2): 182, 2004
38. SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., AYLLÓN, M. A. & DAWSON, W. O. "Frameshift mutations in infectious cDNA clones of Citrus tristeza virus: A strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*". *Virology*, 313 (2): 481, 2003.
39. PERONI, L. A., LORENCINI, M., DOS REIS, J. R. R., MACHADO, M. A. & STACH-MACHADO, D. R. "Differential diagnosis of Brazilian strains of Citrus tristeza virus by epitope mapping of coat protein using monoclonal antibodies". *Virus Res.*, 145 (1): 18, 2009.
40. PAUL, M. J., PRIMAVESI, L. F., JHURREEA, D. & ZHANG, Y. "Trehalose Metabolism and Signaling". *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59 (1): 417, 2008.
41. ALEXANDRINO, A. V., GOTO, L. S. & NOVO-MANSUR, M. T. M. "TreA codifies for a trehalase with involvement in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenicity". *PLoS One*, 11 (9): 1, 2016.
42. SASSOLAS, A., BLUM, L. J. & LECA-BOUVIER, B. D. "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors". *Biotechnol. Adv.*, 30 (3): 489, 2012.
43. VIDOTTI, M., CARVALHAL, R. F., MENDES, R. K., FERREIRA, D. C. M. & KUBOTA, L. T. "Biosensors Based on Gold Nanostructures". *J. Braz. Chem. Soc.*, 22 (1): 3, 2011.
44. POURAKBARI, R. *et al.* "Recent progress in nanomaterial-based electrochemical biosensors for pathogenic bacteria". *Microchim. Acta*, 186 (12): 820, 2019.
45. RICCARDI, C. DOS S., DA COSTA, P. I. & YAMANAKA, H. "Imunossensor amperométrico". *Quim. Nova*, 25 (2): 316, 2002.
46. PEI, X. *et al.* "Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review". *Anal. Chim. Acta*, **758**: 1, 2013.
47. LIU, G. & LIN, Y. "Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays". *Talanta*, 74 (3): 308, 2007.
48. HOLFORD, T. R. J., DAVIS, F. & HIGSON, S. P. J. "Recent trends in antibody based sensors". *Biosens. Bioelectron.*, 34 (1): 12, 2012.
49. WAN, Y., SU, Y., ZHU, X., LIU, G. & FAN, C. "Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics".

- Biosens. Bioelectron., **47**: 1, 2013.
50. RADECKA, H. & RADECKI, J. "Label-free Electrochemical Immunosensors for Viruses and Antibodies Detection-Review". J. Mex. Chem. Soc., 59 (4): 269, 2015.
  51. BAHADIR, E. B. & SEZGINTÜRK, M. K. "A review on impedimetric biosensors". Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol., 44 (1): 248, 2016.
  52. NSABIMANA, A., LAN, Y., DU, F. & WANG, C. " Alkaline phosphatase-based electrochemical sensors for health applications". Analytical Methods., 11 (15): 1996, 2019.
  53. PIRO, B. & REISBERG, S. "Recent Advances in Electrochemical Immunosensors". Sensors, 17 (4): 794, 2017.
  54. CHO, I. *et al.* "Current Technologies of Electrochemical Immunosensors : Perspective on Signal Amplification". Sensors, 18 (1): 207, 2018.
  55. ABDULLAH, S. & UDDIN, M. "Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review". RSC Advances, 6 (30): 24995, 2016.
  56. KHATER, M., ESCOSURA-MUÑIZ, A., QUESADA-GONZ, D. & MERKOÇI, A. "Electrochemical detection of plant virus using gold nanoparticle-modified electrodes". Anal. Chim. Acta, **1046** : 123, 2019.
  57. MOREAU, A. L. D. *et al.* "Highly-sensitive and label-free indium phosphide biosensor for early phytopathogen diagnosis". Biosens. Bioelectron., 36 (1): 62, 2012.
  58. SHOJAEI, T. R. *et al.* "Detection of Citrus tristeza virus by using fluorescence resonance energy transfer-based biosensor". Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc., **169** : 216, 2016.
  59. HAJI-HASHEMI, H., NOROUZI, P., SAFARNEJAD, M. R. & GANJALI, M. R. "Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode". Sensors Actuators B Chem. **244** : 211, 2017.
  60. SHOJAEI, T. R. *et al.* "Fluorometric immunoassay for detecting the plant virus Citrus tristeza using carbon nanoparticles acting as quenchers and antibodies labeled with CdTe quantum dots". Microchim. Acta, 183 (7): 2277, 2016.
  61. SAFARNEJAD, M. R., SAMIEE, F., TABATABAIE, M. & MOHSENFAR, A. "Development of quantum dot-based nanobiosensors against Citrus tristeza virus (CTV)". Sensors & Transducers, 213 (6): 54, 2017.
  62. AFONSO, A. S. *et al.* "QCM immunoassay for recombinant cysteine peptidase: A potential protein biomarker for diagnosis of citrus canker".

- Talanta, **104** : 193, 2013.
63. HAJI-HASHEMI, H. *et al.* "Sensitive electrochemical immunosensor for citrus bacterial canker disease detection using fast Fourier transformation square-wave voltammetry method". J. Electroanal. Chem., **820** : 111, 2018.
  64. HAJI-HASHEMI, H., HABIBI, M. M., SAFARNEJAD, M. R., NOROUZI, P. & GANJALI, M. R. "Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease". Sensors Actuators, B Chem., **275**: 61, 2018.
  65. RICCI, F., ADORNETTO, G. & PALLESCHI, G. "A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors". Electrochim. Acta, **84** : 74, 2012.
  66. XU, Y. & WANG, E. "Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles". Electrochim. Acta, **84** : 62, 2012.
  67. YÁÑEZ-SEDEÑO, P., CAMPUZANO, S. & PINGARRÓN, J. M. "Magnetic particles coupled to disposable screen printed transducers for electrochemical biosensing". Sensors (Switzerland), 16 (10): 1585, 2016.
  68. KRISHNAN, S. & GOUD, K. Y. "Magnetic Particle Bioconjugates : A Versatile Sensor Approach". Magnetochemistry, 5 (4): 64, 2019.
  69. TORMIN, T. F., CUNHA, R. R., DA SILVA, R. A. B., MUNOZ, R. A. A. & RICHTER, E. M. "Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system". Sensors Actuators, B Chem., **202** : 93, 2014.
  70. DE ARAUJO, W. R. *et al.* "Portable analytical platforms for forensic chemistry: A review". Anal. Chim. Acta, **1034** : 1, 2018.
  71. WU, M. Y. C. *et al.* "Point-of-care detection devices for food safety monitoring: Proactive disease prevention". Trends Biotechnol., 35 (4): 288, 2017.
  72. PEELING, R. W. & MABEY, D. "Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world". Clin. Microbiol. Infect., 16 (8): 1062, 2010.
  73. LAU, H. Y. & BOTELLA, J. R. "Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection". Front. Plant Sci., **8** : 1, 2017.
  74. SIA, S. K. & WHITESIDES, G. M. "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies". Electrophoresis, 24 (21): 3563, 2003.
  75. HALLDORSSON, S., LUCUMI, E., GÓMEZ-SJÖBERG, R. &

- FLEMING, R. M. T. "Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices". *Biosens. Bioelectron.*, **63** : 218, 2015.
76. NASSERI, B., SOLEIMANI, N., RABIEE, N., KALBASI, A. & KARIMI, M. "Biosensors and Bioelectronics Point-of-care micro fluidic devices for pathogen detection". *Biosens. Bioelectron.*, **117**, 112, 2018.
77. BECKER, H. & LOCASCIO, L. E. "Polymer microfluidic devices". *Talanta*, **56** : 267, 2002.
78. CHIKKAVEERAI AH, B. V., LIU, H., MANI, V., PAPADIMITRAKOPOULOS, F. & RUSLING, J. F. "A microfluidic electrochemical device for high sensitivity biosensing: Detection of nanomolar hydrogen peroxide". *Electrochem. commun.*, 11(4): 819, 2009.
79. ROMANOV, V. *et al.* "FDM 3D printing of high-pressure, heat-Resistant, Transparent Microfluidic Devices". *Anal. Chem.*, **90** : 10450, 2018.
80. FU, L.-M. & WANG, Y.-N. "Detection Methods and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices". *TrAC Trends Anal. Chem.*, **107** : 196, 2018.
81. AFONSO, A. S., ULIANA, C. V., MARTUCCI, D. H. & FARIA, R. C. "Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications". *Talanta*, **146** : 381, 2016.
82. ULIANA, C. V., PEVERARI, C. R., AFONSO, A. S., COMINETTI, M. R. & FARIA, R. C. "Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker". *Biosens. Bioelectron.*, **99** : 156, 2018.
83. KUDR, J., KLEJDUS, B., ADAM, V. & ZITKA, O. "Magnetic solids in electrochemical analysis". *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **98**: 104, 2018.
84. SCHLADT, T. D., SCHNEIDER, K., SCHILD, H. & TREMEL, W. "Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment". *Dalt. Trans.*, **40** : 6315, 2011.
85. WU, W., WU, Z., YU, T., JIANG, C. & KIM, W. S. "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications". *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **16**, 2015.
86. PASTUCHA, M., FARKA, Z., LACINA, K., MIKU, Z. & SKLÁDAL, P. "Magnetic nanoparticles for smart electrochemical immunoassays: a review on recent developments". *Microchim. Acta*, **186**: 312, 2019.
87. DIXIT, C. K. *et al.* "Electrochemistry-based approaches to low cost, high sensitivity, automated, multiplexed protein immunoassays for cancer diagnostics". *Analyst*, **141**: 536, 2016.

88. KURAMITZ, H. "Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays". *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (1): 61, 2009.
89. HERRASTI, Z., DE LA SERNA, E., RUIZ-VEGA, G. & BALDRICH, E. "Developing enhanced magnetoimmunosensors based on low-cost screen-printed electrode devices". *Rev. Anal. Chem.*, 35 (2): 53, 2016.
90. CENTI, S., LASCHI, S., FRÁNEK, M. & MASCINI, M. "A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs)". *Anal. Chim. Acta*, **538** : 205, 2005.
91. PEDRERO, M. *et al.* "Disposable Amperometric Immunosensor for the Determination of Human P53 Protein in Cell Lysates Using Magnetic Micro-Carriers". *Biosensors*, 6 (4): 56, 2016.
92. LIN, H. Y. *et al.* "Integrated Magneto-Chemical Sensor for On-Site Food Allergen Detection". *ACS Nano*, **11**: 10062, 2017.
93. TORRENTE-RODRIGUEZ, R. M. *et al.* "Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates". *PLoS One*, 12 (4): 1, 2017.
94. MUNGE, B. S. *et al.* "Nanostructured immunosensor for attomolar detection of cancer biomarker interleukin-8 using massively labeled superparamagnetic particles". *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 50 (34): 7915, 2011.
95. MALHOTRA, R. *et al.* "Ultrasensitive detection of cancer biomarkers in the clinic by use of a nanostructured microfluidic array". *Anal. Chem.*, 84 (14): 6249, 2012.
96. OTIENO, B. A. *et al.* "On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers". *Biosens. Bioelectron.*, **53**: 268, 2014.
97. BALDO, T. A. Desenvolvimento de dispositivos descartáveis e de baixo custo para a detecção de biomarcadores relacionados ao câncer de colo uterino e endometrial. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2019. Tese de doutorado, 124 p.
98. MANI, V., CHIKKAVEERIAIAH, B. V., PATEL, V., GUTKIND, J. S. & RUSLING, J. F. "Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification". *ACS Nano*, 3 (3): 585, 2009.
99. DE OLIVEIRA, R. A. G., MATERON, E. M., MELENDEZ, M. E., CARVALHO, A. L. & FARIA, R. C. "Disposable microfluidic immunoarray device for sensitive breast cancer biomarker detection". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9 (33): 27433, 2017.

100. DE OLIVEIRA, T. R., MARTUCCI, D. H. & FARIA, R. C. "Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay". *Sensors Actuators, B Chem.*, 255 (parte 1): 684, 2018.
101. KRAUSE, C. E. *et al.* "Ultrasensitive microfluidic array for serum pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein to assess oral mucositis risk in cancer patients". *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (23): 7239, 2015.
102. MURALI, K., NEELAKANDAN, M. S. & THOMAS, S. "Biomedical applications of gold nanoparticles". *JSM Nanotechnol Nanomed*, 6 (1): 1064, 2018.
103. KHAN, I., SAEED, K. & KHAN, I. "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities". *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (7): 908, 2017.
104. RUSLING, J. F. & ITO, K. "Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator". *Anal. Chim. Acta*, 252 (1-2): 23, 1991.
105. BISHOP, G. W., AHIADU, B. K., SMITH, J. L. & PATTERSON, J. D. "Use of redox probes for characterization of layer-by-layer gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrodes". *J. Electrochem. Soc.*, **164**: 23, 2017.
106. REGIDI, S. *et al.* "Effect of lyophilization on HRP–antibody conjugation: an enhanced antibody labeling technology". *BMC Res. Notes*, **11**: 596, 2018.
107. XIONG, P. *et al.* "An ultrasensitive electrochemical immunosensor for alpha-fetoprotein using an envision complex-antibody copolymer as a sensitive label". *Materials (Basel)*, 5 (12): 2757, 2012.
108. GAN, N., JIN, H., LI, T. & ZHENG, L. "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein". *Int. J. Nanomedicine*, **6**: 3259, 2011.
109. AHAMMAD, A. J. S. "Hydrogen peroxide biosensors based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin". *J. Biosens. Bioelectron.*, 2013.
110. HUANG, J., HUANG, W. & WANG, T. "Catalytic and inhibitory kinetic behavior of horseradish peroxidase on the electrode surface". *Sensors*, **12**: 14556, 2012.
111. DEGRAND, C., LIMOGE, B., MARTRE, A. M. & SCHÖLLHORN, B. "Determination of horseradish peroxidase and a peroxidase-like iron porphyrin at a Nafion-modified electrode". *Analyst*, **126**: 887, 2001.
112. ALVARENGA JUNIOR, B. R. *et al.* "Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Determination of B-complex vitamins in pharmaceutical formulations by surface-enhanced Raman

- spectroscopy". *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **188**: 589, 2018.
113. PROENÇA, C. A. *et al.* "Use of data processing for rapid detection of the prostate-specific antigen biomarker using immunomagnetic sandwich-type sensors". *Beilstein J. Nanotechnol.*, **10**: 2171, 2019.
  114. PROENÇA, C. A. *et al.* "Novel enzyme-free immunomagnetic microfluidic device based on  $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  for cancer biomarker detection". *Anal. Chim. Acta*, **1071**: 59, 2019.
  115. WILSON, D. *et al.* "Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides" *Talanta*, **194**: 611, 2019.
  116. FREITAS, T. A. *et al.* "Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device". *Talanta*, **205**, 2019.
  117. AFONSO, A. S. *et al.* "Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles". *Biosens. Bioelectron.*, 40 (1): 121, 2013.
  118. LKHANI, H., SARPARAST, M., NOORI, A., BATHAIE, S. Z. & MOUSAVI, M. F. "Electrochemical aptamer/antibody based sandwich immunosensor for the detection of EGFR, a cancer biomarker, using gold nanoparticles as a signaling probe". *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 491, 2015.
  119. AMBROSI, A. *et al.* "Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis". *Anal. Chem.*, 79 (14): 5232, 2007.
  120. SERAFÍN, V. *et al.* "Comparative evaluation of the performance of electrochemical immunosensors using magnetic microparticles and nanoparticles. Application to the determination of tyrosine kinase receptor AXL". *Microchim Acta*, 184(11): 4251, 2017.
  121. FERREIRA, G. R., SEGURA, T., DE SOUZA, F. G., UMPIERRE, A. P. & MACHADO, F. "Synthesis of poly(vinyl acetate)-based magnetic polymer microparticles". *Eur. Polym. J.*, 48 (12): 2050, 2012.
  122. SILVA, V. A. J. *et al.* "Synthesis and characterization of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles coated with fucan polysaccharides". *J. Magn. Magn. Mater.*, **343**: 138, 2013.
  123. AMBROSI, A., AIRÒ, F. & MERKOÇI, A. "Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker". *Anal. Chem.*, 82 (3): 1151, 2010.
  124. ESCOSURA-MUÑIZ, A. DE LA, PAROLO, C. & MERKOÇI, A. "Immunosensing using nanoparticles". *Mater. today*, 13 (7–8): 24, 2010.
  125. GUERRERO, S. *et al.* "Click chemistry-assisted antibodies

- immobilization for immunosensing of CXCL7 chemokine in serum". *J. Electroanal. Chem.*, **837**: 246, 2019.
126. AGDIA. "ImmunoStrip para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac)". Disponível em: <https://orders.agdia.com/agdia-immunostrip-for-xac-isk-92200>. (Acessado em: 15 de Fevereiro de 2019)
127. YAN, Q. *et al.* "Label-free immunosensors based on a novel multi-amplification signal strategy of TiO<sub>2</sub>-NGO/Au@Pd hetero-nanostructures". *Biosens. Bioelectron.*, **127**: 174, 2019.
128. LIU, P. *et al.* "An ultrasensitive electrochemical immunosensor for procalcitonin detection based on the gold nanoparticles-enhanced tyramide signal amplification strategy". *Biosens. Bioelectron.*, **126**: 543, 2019.
129. ZHANG, Y. *et al.* "A molybdenum disulfide/gold nanorod composite-based electrochemical immunosensor for sensitive and quantitative detection of microcystin-LR in environmental samples". *Sensors Actuators, B Chem.*, **244**: 606, 2017.
130. WANG, C., JIANG, T., ZHAO, K., DENG, A. & LI, J. "A novel electrochemiluminescent immunoassay for diclofenac using conductive polymer functionalized graphene oxide as labels and gold nanorods as signal enhancers". *Talanta*, **193**, 184, 2019.
131. OJEDA, I., MORENO-GUZMÁN, M., GONZÁLEZ-CORTÉS, A., YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J. M. "Electrochemical magnetic immunosensors for the determination of ceruloplasmin". *Electroanalysis*, **25** (9): 2166, 2013.
132. GUERRERO, S., AGÜÍ, L., YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J. M. "Screen-printed Gold Electrodes Functionalized with Grafted p-Aminobenzoic Acid for the Construction of Electrochemical Immunosensors. Determination of TGF- $\beta$ 1 Cytokine in Human Plasma". *Electroanalysis*, **30** (7): 1327, 2018.
133. SERAFÍN, V., AGÜÍ, L., YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J. M. "Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes". *Sensors Actuators, B Chem.*, **195**, 494, 2014.
134. PUTZBACH, W. & RONKAINEN, N. J. "Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review". *Sensors (Switzerland)*, **13** (4): 4811, 2013.
135. WU, M. *et al.* "Ultrasensitive immunosensor for acrylamide based on chitosan / SnO<sub>2</sub>-SiC hollow sphere nanochains / gold nanomaterial as signal amplification". *Anal. Chim. Acta*, **1049**: 188, 2019.
136. FERREIRA, C. S. *et al.* Uso de nanobastões de ouro para o

- desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. *Quim. Nova*, 40 (5): 594, 2017.
137. ARAGAY, G., PONS, J. & MERKOL, A. "Enhanced electrochemical detection of heavy metals at heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrodes". *J. Mater. Chem.*, 21 (12): 4326, 2011.
  138. SERRA, B., MORALES, M. D., REVIEJO, A. J., HALL, E. H. & PINGARRÓN, J. M. "Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor". *Anal. Biochem.*, 336 (2): 289, 2005.
  139. OJEDA, I., MORENO-GUZMÁN, M., GONZÁLEZ-CORTÉS, A., YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J. M. "A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk". *Analyst*, 138 (15): 4284, 2013.
  140. DINCER, C., BRUCH, R., KLING, A., DITTRICH, P. S. & URBAN, G. A. "Multiplexed Point-of-Care Testing – xPOCT". *Trends Biotechnol.* 35 (8): 728, 2017.