



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Pablo César Serrano Arámbulo

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES BASEADOS EM APTÂMEROS PARA  
DETECÇÃO DE SAXITOXINA POR IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA**

Florianópolis  
2023

Pablo César Serrano Arámbulo

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES BASEADOS EM APTÂMEROS PARA  
DETECÇÃO DE SAXITOXINA POR IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Física.  
Orientador: Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold.  
Coorientadora: Dra. Gisele Elias Nunes

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Serrano Arambulo , Pablo  
Desenvolvimento de biossensores baseados em aptâmeros  
para detecção de saxitoxina por impedância eletroquímica /  
Pablo Serrano Arambulo ; orientador, Ivan Bechtold,  
coorientadora, Gisele Nunes, 2023.  
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Física, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Física. 2. Biossensor. 3. Aptâmero. 4. Saxitoxina. 5.  
Impedância eletroquímica. I. Bechtold, Ivan . II. Nunes,  
Gisele . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

Pablo César Serrano Arámbulo

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES BASEADOS EM APTÂMEROS PARA  
DETECÇÃO DE SAXITOXINA POR IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Lucas Fugikawa Santos  
Instituição UNESP-Rio Claro

Profª. Dra. Cristiane Luisa Jost  
Instituição UFSC

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig  
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Física.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold  
Orientador

Florianópolis

2023

Dedicado ao meu país, o Peru, que tanto precisa de pesquisa científica e tecnológica.

## **AGRADECIMENTOS**

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Física (PPGFSC), ao Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA) e ao Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica (INEO).

Este trabalho não teria sido possível sem o financiamento das agências de fomento CAPES, CNPQ e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (fapesc).



## RESUMO

A saxitoxina (STX) é uma neurotoxina que consumida em altas concentrações pode causar a morte em humanos e animais. Na Lagoa do Peri, localizada na Ilha de Florianópolis, capital de SC no Brasil, tem sido observada STX desde 1994, apesar disso, a lagoa abastece de água potável, após tratamento, a mais de 100 mil habitantes. Desde seu desenvolvimento, os aptâmeros (APTs) se tornaram um tipo muito atraente de sondas de reconhecimento molecular, sendo muito solicitados em vários campos, como monitoramento ambiental, análise biológica e segurança alimentar. Os APTs podem ser imobilizados sobre eletrodos para desenvolver aptasensores eletroquímicos que são dispositivos analíticos vantajosos para detecção sensível, contínua e em tempo real. Especificamente, aptasensores impedimétricos utilizam a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), a qual é uma técnica não invasiva, devido que não perturbam a amostra em estudo por causa dos sinais elétricos de baixa amplitude, esses aptasensores oferecem um sistema de baixo custo, portabilidade, capacidade de miniaturização e tempos de detecção rápidos usando quantidades mínimas de volumes de amostra. Nesse contexto, o aptâmero M-30f específico para a STX foi funcionalizado com tiol para ser imobilizado por monocamadas automontadas (SAMs, Self-assembling monolayers) ou drop-casting em um eletrodo de ouro. O anti-incrustante 6-mercaptohexanol (MCH) foi aderido por automontagem para ocupar os espaços vazios deixados pelas imobilizações do M-30f. A caracterização eletroquímica em cada etapa do aptasensor foi por voltametria cíclica (VC) e EIE usando uma solução eletrolítica. Nas etapas de imobilização do M-30f e aderência do MCH, uma diminuição na corrente Faradaica e um aumento na resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ) foram observados. Na detecção da STX, aconteceu o contrário, ou seja, um incremento na corrente Faradaica e um decréscimo  $\Delta R_{tc}$ . Esse último decréscimo  $\Delta R_{tc}$  foi utilizado para a detecção de STX, observando-se um decréscimo na  $R_{tc}$  proporcional ao aumento da concentração da STX, no aptasensor onde o M-30f foi imobilizado por drop-casting. O biossensor eletroquímico detectou a STX na faixa de concentrações entre 0,3 e 30  $\mu\text{g}/\text{L}$ , a partir desses dados, uma curva de calibração para a detecção de STX foi feita, observando-se que um decréscimo  $\Delta R_{tc}$  de 30% corresponde à concentração limite de 3  $\mu\text{g}/\text{L}$  na água potável e que o limite de detecção obtido pelo aptasensor foi de 0,3  $\mu\text{g}/\text{L}$ , correspondente a 10% da concentração limite da STX. Além disso, o biossensor demonstrou ser seletivo em experimentos de controle negativo com a microcistina-LR (MCLR), outra cianotoxina, indicando que não há alteração significativa no decréscimo  $\Delta R_{tc}$  na presença de MCLR quando comparado com a STX, demonstrando ser uma alternativa promissora para a detecção da STX em água. Como aplicação prospectiva, o aptasensor pode ser testado em amostras reais de água da Lagoa do Peri, utilizando como referência a curva de calibração obtida nesse trabalho.

**Palavras-chave:** Biossensor, Aptâmero, Saxitoxina, Impedância eletroquímica.



## ABSTRACT

Saxitoxin (STX) is a neurotoxin that consumed in high concentrations can cause death in humans and animals. In Peri Lagoon, located on Florianópolis Island, capital of SC in Brazil, STX has been observed since 1994, despite this, the lagoon supplies drinking water, after treatment, to more than 100 thousand inhabitants. Since their development, aptamers (APTs) have become a very attractive type of molecular recognition probes, being much in demand in various fields such as environmental monitoring, biological analysis and food safety. APTs can be immobilized on electrodes to develop electrochemical aptasensors that are advantageous analytical devices for sensitive, continuous, real-time detection. Specifically, impedimetric aptasensors use electrochemical impedance spectroscopy (EIS), which is a non-invasive technique, as they do not disturb the sample under study because of low-amplitude electrical signals, these aptasensors offer a low cost, portability, miniaturization capability and fast detection times using minimal amounts of sample volumes. In this context, the STX-specific aptamer M-30f was functionalized with thiol to be immobilized by self-assembling monolayers (SAMs) or drop-casting on a gold electrode. The antifouling 6-mercaptophexanol (MCH) was adhered by self-assembly to fill the empty spaces left by the M-30f immobilizations. The electrochemical characterization in each step of the aptasensor was by cyclic voltammetry (CV) and EIS using an electrolyte solution. In the M-30f immobilization and MCH adhesion stages, a decrease in Faradaic current and an increase in charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) were observed. In the detection of the STX, the opposite happened, ie, an increase in the Faradaic current and a decrease  $\Delta R_{ct}$ . This last decrease in  $R_{ct}$  was used for the detection of STX, observing a decrease in  $R_{ct}$  proportional to the increase in STX concentration, in the aptasensor where M-30f was immobilized by drop-casting. The electrochemical biosensor detected STX in the range of concentrations between 0,3 – 30  $\mu\text{g}/\text{L}$ , from this data, a calibration curve for the detection of STX was made, observing that a  $\Delta R_{ct}$  decrement of 30% corresponds to the concentration limit of 3  $\mu\text{g}/\text{L}$  in drinking water and that the detection limit obtained by the aptasensor was 0,3  $\mu\text{g}/\text{L}$ , corresponding to 10% of the limit concentration of STX. Furthermore, the biosensor proved to be selective in negative control experiments with microcystin-LR (MCLR), another cyanotoxin, indicating that there is no significant change in the decrease in  $\Delta R_{ct}$  in the presence of MCLR when compared to STX, demonstrating be a promising alternative for the detection of STX in water. As a prospective application, the aptasensor can be tested in real water samples from Peri Lake, using the calibration curve obtained in this work as a reference.

**Keywords:** Biosensor, Aptamer, Saxitoxin, Electrochemical impedance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Classificação de sensores com base em mensuração, energia/potência, contato físico, conversão de sinal, sinal de saída, comparabilidade, material do sensor, especificação e aplicações. ....	16
Figura 1.2 Artigos de pesquisa publicados sobre aptasensores eletroquímicos de acordo com a Web of Science. ....	17
Figura 2.1 O Professor Leland C. Clark Jr. (1918–2005) “Pai dos biossensores” .....	20
Figura 2.2 Componentes gerais de um biossensor .....	22
Figura 2.3 Vantagens dos biossensores.....	22
Figura 2.4 Diferentes aplicações dos biossensores. ....	23
Figura 2.5 Classificação de biossensores baseados em vários .....	24
Figura 2.6 Ilustração esquemática do mecanismo/princípio.....	26
Figura 2.7 Monitor digital de glicose com tira de teste e curva de conforto. ....	27
Figura 2.8 Esquema geral explicando o princípio de funcionamento de um biossensor impedimétrico, antes e depois da ligação do analito.....	28
Figura 2.9 Exemplos de aplicações de biossensores por afinidade para a determinação de um analito específico. a) Biossensor baseado num aptâmero para ampicilina b) Biossensor eletroquímico baseado num peptídeo para anticorpos c) Biossensor íon eletroquímico baseado numa sonda de DNA. ....	30
Figura 2.10 Diagrama esquemático de um biossensor típico que consiste num bioreceptor, transdutor, sistema eletrônico e display e vários tipos de bioreceptores e transdutores usados nos biossensores também são mostrados. ....	31
Figura 2.11 Visão geral conformacional e interacional de APTs e seus receptores: A. A conformação sequencial e a estrutura secundária do APT comercializado Macugen. B. Ilustração esquemática e modelo molecular do DNA quádruplo para um APT. C. Estrutura do APT C13 de RNA e seu receptor GRK2. ....	31
Figura 2.12 Comparação do peso molecular (PM) e do tamanho físico entre o aptâmero (APT) (esquerda) vs anticorpo (direita). PM: 5-15kDa vs 150-1000kDa, Tamanho(diâmetro): 2-3nm vs. 12-15nm.....	33
Figura 2.13 Estrutura de um ditiol aromático ( $C_{16}H_{26}OS_2$ ) e dois monotióis, decano-1-tiol ( $C_{10}H_{22}S$ ) e octadecano-1-tiol ( $C_{18}H_{38}S$ ). Os átomos de enxofre, carbono, hidrogênio e oxigênio são representados por esferas amarelas, cinzas, brancas e vermelhas, respectivamente.....	35

Figura 2.14 Analitos detectados na análise de alimentos e água, bem como os eletrodos e técnicas eletroanalíticas utilizadas nos aptasensores eletroquímicos, destacando-se num retângulo em vermelho os elementos utilizados nessa pesquisa.....	36
Figura 2.15 Esquema das SAMs de um alcanotiol adsorvidas num eletrodo de Au. (A) SAMs de alcanotióis numa configuração em pé. Vermelho: átomo de S, azul: átomo de C, branco: átomo de H. (B) Configuração típica de um biossensor que consiste em APTs (em azul) funcionalizado com um grupo tiol em uma de suas extremidades e o anti-incrustante Mercaptohexanol (SOH) para preencher os espaços vazios deixados pelo APT e assim evitar ligações inespecíficas.....	37
Figura 2.16 Formação de um filme a partir de uma solução usando a técnica de drop-casting, passando das etapas de deposição, evaporação e secagem.....	38
Figura 2.17 Ilustração dos mecanismos de anti-incrustação e das propriedades anti-incrustantes na superfície de eletrodos. ....	40
Figura 2.18 Estratégias de materiais anti-incrustantes explorados nos eletrodos por meio de modificação química. Em retângulo rosa a estratégia utilizada nesse trabalho. ....	41
Figura 2.19 Rede de áreas impactadas pelas florações de algas nocivas (FANs) e as cianobactérias que eles produzem. Estes incluem, mas não estão limitados a: (a) agricultura, (b) vida marinha, (c) pesca, (d) moluscos de concha/restaurantes e (e) água potável. ....	44
Figura 2.20 Estruturas químicas das principais cianotoxinas relevantes em amostras ambientais e alimentares.....	45
Figura 2.21 A) Estrutura geral das saxitoxinas (STXs) B) Dependendo dos grupos funcionais R1, R2, R3 e R4(R4-1, R4-2, R4-3, R4-4), a família pode ser subdividida em quatro grupos: saxitoxinas (STXs), neosaxitoxinas (NeoSTXs), gonyautoxinas (GTXs) e saxitoxinas descarbamoil (dcSTX), respectivamente. ....	47
Figura 2.22 Localização da Lagoa do Peri (parte superior) e sinalização do Canal do Sangradouro em linha sólida preta com números de #1-5# (parte inferior).....	51
Figura 2.23 Na EIE um potencial de entrada $E_t$ é aplicado através de um sistema eletroquímico, resultando numa corrente $I_t$ de saída com uma diferença de fase $\phi$ .....	55
Figura 2.24 Estrutura da dupla camada elétrica feita a partir das contribuições de Helmholtz, Stern, Gouy e Chapman. ....	58
Figura 2.25 a) Dupla camada de Helmholtz e O b) modelo de circuito de Warburg com melhorias adicionais por c) Fricke e d) Randles. e) Célula de Randles moderna.....	60

Figura 2.26 a. O gráfico de Nyquist ( $Z''$ vs $Z'$ ) b. O CEE de Randles para o ajuste das curvas de impedância. ....	61
Figura 2.27 Diagramas de Bode log-log do módulo da impedância ( $ Z $ ) vs a frequência ( $f$ ) e inseridos os CEEs de Randles para o ajuste das curvas a. Com a fase ( $\phi$ ) e sem difusão de Warburg $ZW$ b. Sem a fase e com a impedância de $ZW$ . ....	62
Figura 2.28 Um voltamograma cíclico mostrando a presença de uma reação eletroquímica redox caracterizada por picos de redução (catódicos) e de oxidação (anódicos) nos potenciais $E_{pc}$ e $E_{pa}$ , respectivamente, e as correntes catódica ( $ipc$ ) e anódica ( $ipa$ ) associadas. ....	64
Figura 3.1 No voltamograma cíclico mostrado, a diferença de potencial das posições das correntes de pico anódica $V_{pa}$ e catódica $V_{pc}$ , rotuladas como $\Delta V$ , é usada como medida de limpeza. ....	68
Figura 3.2 O eletrodo de trabalho de Au do aptasensor impedimétrico e sua respectiva máscara. ....	69
Figura 3.3 Estrutura química do anti-incrustante MCH em 2D e 3D. No gráfico em 3D, em cinza os átomos de C, branco H, amarelo S e vermelho O. ....	71
Figura 3.4 A. Célula eletroquímica B. Etapas do aptasensor impedimétrico i) Au/M-30f, ii) Au/M-30f/MCH e iii) Au/M-30f/MCH/STX C. Gráficos de impedância antes e depois da detecção da STX. ....	73
Figura 4.1 As curvas de VC das limpezas e suas combinações: A. Para o grupo 1 de KOH B. Para o grupo 2 de $H_2SO_4$ . ....	75
Figura 4.2 As curvas de Nyquist da EIE das limpezas e suas combinações: A. Para o grupo 1 de KOH B. Para o grupo 2 de $H_2SO_4$ . ....	76
Figura 4.3 A. Voltamogramas cíclicos e B. Diagramas de Nyquist das imobilizações por SAMs das três sequências funcionalizadas com tiol APT1, APT2 e M-30f. ....	78
Figura 4.4 A. VCs e B. Diagramas de Nyquist das imobilizações por drop-casting das três sequências funcionalizadas com tiol APT1, APT2 e M-30f. ....	79
Figura 4.5 Os diagramas de Bode das imobilizações por drop-casting das três funcionalizações com tiol APT1, APT2 e M-30f. A. $Z''$ vs frequência ( $f$ ) em escala logarítmica B. A fase $\phi$ vs $\log f$ . ....	80
Figura 4.6 Otimização da etapa de imobilização por SAMs do M-30f. A. Para várias concentrações do M-30f. B. Tempo ideal de incubação para a concentração de $1\mu M$ . ....	82

Figura 4.7	Optimização da imobilização por drop-casting do M-30f. A. Para várias concentrações do M-30f. B. Para diferentes volumes do M-30f na concentração de 1µM. C. O tempo de evaporação ideal do M-30f para a concentração de 1µM e o volume de 5µL.....	83
Figura 4.8	A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode, para três etapas do aptasensor, a limpeza do eletrodo de Au, a imobilização por SAMs do M-30f e a aderência do anti-incrustante MCH.....	85
Figura 4.9	Voltametrias cíclicas B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode, para três etapas do aptasensor, a limpeza do eletrodo de Au, a imobilização por drop-casting do M-30f e a aderência do anti-incrustante MCH.....	87
Figura 4.10	Otimização do tempo de incubação para a aderência do anti-incrustante MCH nos eletrodos contendo o M-30f imobilizado por A. SAMs e B. Drop-casting. ....	89
Figura 4.11	Caracterização eletroquímica das quatro etapas do aptasensor: O Au limpo, a imobilização por SAMs do M-30f, a aderência do MCH e ligação de 0,3µg/L da STX. A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode. ....	91
Figura 4.12	Caracterização eletroquímica das quatro etapas do aptasensor: O Au limpo, a imobilização por drop-casting do M-30f, a aderência do MCH e a ligação da STX. A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode. ....	93
Figura 4.13	As respostas do aptasensor impedimétrico em diferentes tempos de incubação para a solução de 30µg/L de STX.....	96
Figura 4.14	Os diagramas de Nyquist mostrando a interação do tampão Tris da STX com o aptasensor Au/M-30f/MCH e posterior detecção de STX A. Dispositivo A e B. Dispositivo B.....	97
Figura 4.15	A resposta do biossensor impedimétrico para diferentes concentrações de STX na faixa entre 0,3 e 30µg/L em A. Os diagramas de Nyquist e B. A curva de calibração. ....	98
Figura 4.16	Análise da especificidade do aptasensor entre a STX e MCLR.....	99

## **LISTA DE QUADROS**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Organização dos grupos de limpeza 1 e 2 .....	67
Tabela 4.1 O resumo dos resultados de $\Delta V$ e $R_{tc}$ para todas as limpezas e suas combinações com suas respectivas diminuições $\Delta V\%$ e $\Delta R_{tc}\%$ com relação ao eletrodo sem limpar. ....	77
Tabela 4.2 Os valores de $\Delta R_{tc}$ das imobilizações dos APTs por SAMs e drop-casting, utilizando $\Delta R_{tc} = R_{tcAPT} - R_{tcAu}$ e o ajuste das curvas com o CEE de Randles. ....	81
Tabela 4.3 Os valores da aderência do MCH nas imobilizações por SAMs e drop-casting do M-30f, utilizando $\Delta R_{tc} = R_{tcMCH} - R_{tcM - 30f}$ , $R_{tcMCH}/R_{tcM - 30f}$ e o CEE de Randles.....	89
Tabela 4.4 Os valores das $R_{tc}$ e dos decrementos $\Delta R_{tc} = 1 - R_{tcmenor}/R_{tcmaior}$ para o MCH, tampão Tris e STX. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IUPAC União Internacional de Química Pura e Aplicada

DNA ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA)

RNA ácido ribonucleico (ARN ou RNA)

APT aptâmero

APTs aptâmeros

SELEX evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (do inglês, systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

SAMs Monocamadas automontadas (SAMs, do Inglês Self-assembling monolayers)

MCH 6-mercaptopexanol

FANs Florações de algas nocivas

HABs Florações de algas nocivas (do inglês Harmful algal blooms)

ATX Anatoxina

CYN Cilindrospermopsina

MCLR Microcistina LR

STX Saxitoxina

VC Voltametria cíclica

EIE espectroscopia de impedância eletroquímica.

CEE circuito elétrico equivalente

DCE dupla camada elétrica



## LISTA DE SÍMBOLOS

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Biossensores .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Princípio de operação dos Biossensores .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Biossensores: vantagens e aplicações.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Classificação dos biossensores .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Biossensores eletroquímicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Classificação baseada na forma de transdução.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Biossensores potenciométricos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.2</b>	<b>Biossensores condutimétricos .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.3</b>	<b>Biossensores amperométricos .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.4</b>	<b>Biossensores Impedimétricos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Classificação baseada na forma de bioreconhecimento .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.1</b>	<b>Biossensores catalíticos .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.2</b>	<b>Biossensores de afinidade .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Aptâmeros (APTs) .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Integração dos APTs em biodeteccção .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Técnicas de imobilização do APT.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2.1</b>	<b>Monocamadas automontadas (SAM) .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2.2</b>	<b>Filmes por drop-casting.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4</b>	<b>Bioincrustação e Anti-incrustantes .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>Cianobactérias e cianotoxinas .....</b>	<b>42</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Florações de algas nocivas (FANs) e Cianotoxinas .....</b>	<b>43</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Eventos importantes de intoxicação por cianotoxinas .....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Saxitoxina (STX) .....</b>	<b>46</b>
<b>2.5.3.1</b>	<b>Deteccção convencional vs Biodeteccção de STX.....</b>	<b>49</b>

2.5.3.2 Lagoa do Peri: Cianobactérias e STX .....	50
2.6 Técnicas Eletroquímicas .....	52
2.6.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) .....	53
2.6.1.1 A Dupla Camada Elétrica (DCE).....	57
2.6.1.2 Evolução dos Modelos de Circuitos Elétricos Equivalentes (CEEs).....	58
2.6.1.3 Representações da EIE .....	60
2.6.2 Voltametria cíclica (VC) .....	63
<b>3 Materiais e métodos.....</b>	<b>65</b>
3.1 Fabricação e limpeza do eletrodo de trabalho.....	65
3.1.1 Limpeza dos substratos de vidro .....	65
3.1.2 Evaporação das camadas de Cromo (Cr) e Ouro (Au) .....	65
3.1.3 Limpeza do eletrodo de trabalho.....	66
3.1.3.1 Polimento Mecânico (M).....	66
3.1.3.2 Limpeza Química (Q).....	66
3.1.3.3 Limpeza Eletroquímica (EQ).....	66
3.1.3.4 Comparação dos métodos de limpeza.....	67
3.1.4 Fabricação da máscara para o eletrodo de trabalho.....	69
3.2 Sequências dos Aptâmeros (APTs).....	69
3.3 6-Mercaptohexanol (MCH) .....	71
3.4 Ligação da STX .....	72
3.5 Microcistina-LR (MCLR).....	72
3.6 Medidas eletroquímicas .....	72
3.7 Funcionamento do aptasensor impedimétrico .....	73
<b>4 Resultados .....</b>	<b>74</b>
4.1 Estudo sobre os métodos de limpeza no eletrodo de trabalho .....	74
4.2 Imobilização dos APTs.....	77
4.3 Aderência do MCH.....	84

<b>4.4</b>	<b>Detecção da STX .....</b>	<b>90</b>
<b>4.5</b>	<b>Especificidade na detecção: MCLR .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, aproveitamos os resultados da ciência e da tecnologia para desfrutar de uma vida com comodidade. Existem diversos tipos de dispositivos, como computadores, copiadoras, celulares, fornos de microondas, geladeiras, controles remotos, detectores de fumaça, termômetros infravermelhos, que possibilitam a nossa interação com o ambiente físico. Muitos desses aparelhos funcionam utilizando a tecnologia de sensores [1].

Um sensor é definido como um dispositivo que auxilia na detecção de mudanças de determinadas quantidades físicas, entre elas a pressão, o calor, a umidade, o movimento, força e/ou uma quantidade elétrica como corrente e são capazes de transformar tal alteração em sinais que podem ser detectados e mensurados [2]. O sensor é o coração de um sistema de medição. Um sensor ideal deve possuir certas características, como alcance, calibração, sensibilidade, seletividade e especificidade, linearidade, alta resolução, reprodutibilidade, relativamente baixo custo, e tempo de resposta [3].

A tecnologia dos sensores vem sendo considerada cada vez mais importante, devido às diversas aplicações, como monitoramento ambiental e alimentar, diagnóstico médico, manufatura automotiva, industrial, espacial e outras aplicações que vem surgindo e transformado o cenário científico [1].

Os sensores podem ser categorizados como mostrado na Figura 1.1. Dependendo da quantidade física (substância) ou analito a ser medido, como fonte de energia (sensores ativos e passivos), comparabilidade (sensores absolutos e relativos), sensores de contato e não contato, sensores analógicos e digitais e de detecção de sinal [1, 4].

No que diz respeito à detecção de sinal, os sensores podem ser divididos em físicos, químicos, térmicos e biológicos. Esses últimos monitoram processos biomoleculares, como interações anticorpo/antígeno, interações de DNA, interações enzimáticas, entre outros. Os sensores biológicos podem ser referenciados como biossensores [1, 4].

Nas últimas décadas, uma diversidade de biossensores baseados em aptâmeros (APTs) foram relatados. A importância destes sensores é a ligação específica e seletiva de analitos por APTs. Os APTs apresentam estruturas programáveis e podem alternar entre estados de APTs livres, ligação ao alvo e ligação de DNA complementar. Sua versatilidade permite uma gama diversificada de métodos de transdução de sinal, desde a detecção óptica até a eletroquímica. Outra vantagem dos APTs é que eles são particularmente úteis para a ligação e detecção de analitos de baixo peso molecular, como a maioria das toxinas [5].

Figura 1.1 Classificação de sensores com base em mensuração, energia/potência, contato físico, conversão de sinal, sinal de saída, comparabilidade, material do sensor, especificação e aplicações.

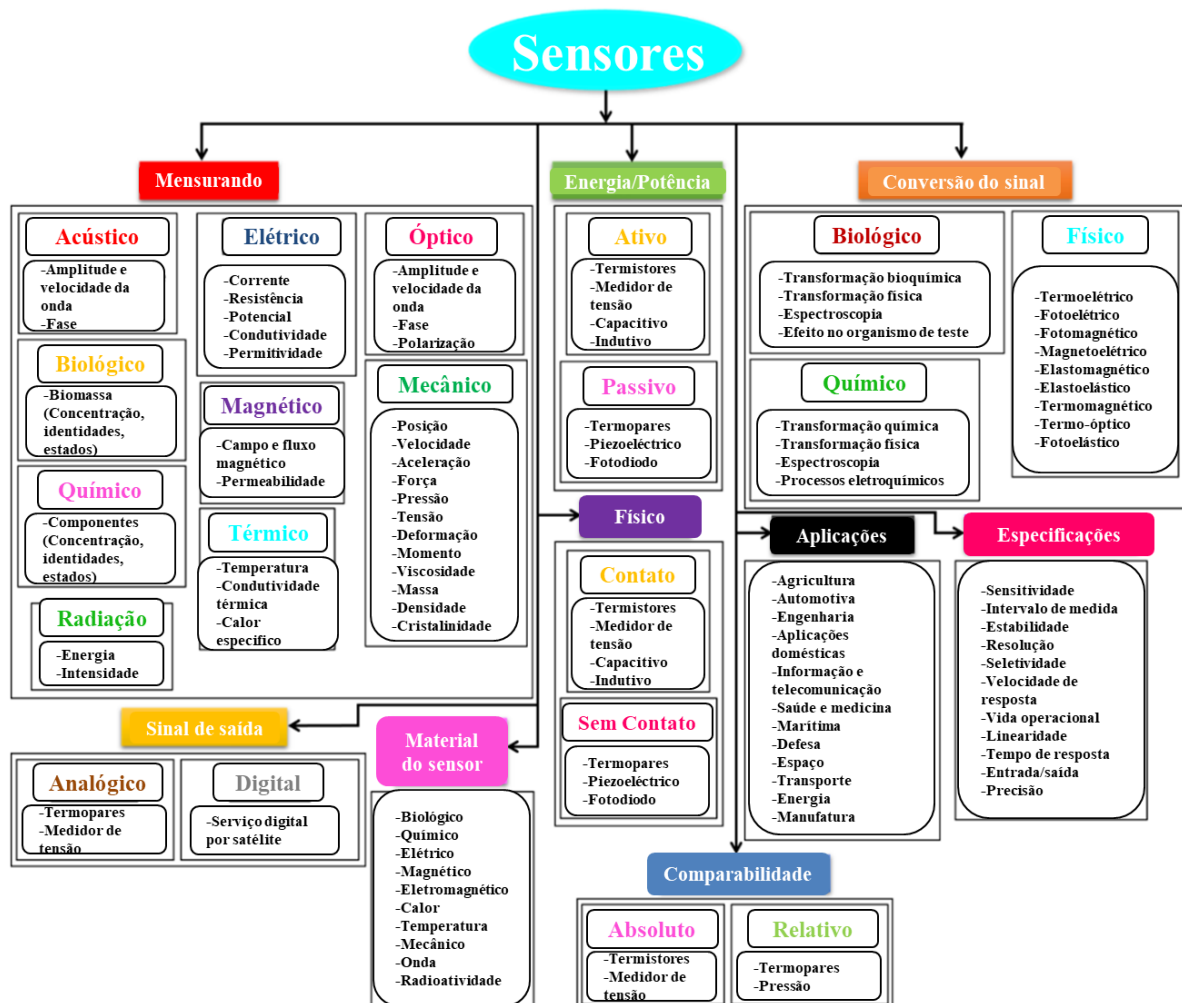


Figura modificada da referência [1]

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos que podem detectar analitos usando bioreceptores catalíticos (enzimas, células, tecidos, etc.) ou de afinidade (anticorpos, APTs, DNA, etc.). A tecnologia dos biossensores eletroquímicos apresentam vantagens que possibilitam a miniaturização, portabilidade e baixo custo, ademais apresentam a especificidade inerente fornecida pelo bioreceptor, combinada com a alta sensibilidade e baixo limite de detecção do transdutor físico-químico. Esses biossensores também são capazes de medições rápidas in situ com o mínimo ou sem preparação de amostra. Assim, biossensores eletroquímicos vem sendo considerados como alternativas promissoras para análise e detecção de uma ampla gama de analitos [6].

Conforme ilustrado na Figura 1.2, o interesse pelos aptasensores eletroquímicos tem crescido continuamente durante a última década. Em 2018, os artigos relacionados a aptasensores eletroquímicos representaram cerca de 28% do total de artigos publicados sobre biossensores eletroquímicos, conforme divulgado pela *Web of Science*. Esse crescimento extraordinário é suportado pelas demandas sociais e econômicas por novos dispositivos analíticos portáteis para medicina e outras aplicações relacionadas à saúde, para a detecção de biomarcadores para doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC), doenças respiratórias crônicas e tuberculose. Outras aplicações, como controle de qualidade e segurança de alimentos, monitoramento ambiental in situ, controle de produção industrial e agrícola, segurança e biodefesa também são promissores com esse tipo de biossensores [7].

Figura 1.2 Artigos de pesquisa publicados sobre aptasensores eletroquímicos de acordo com a Web of Science.

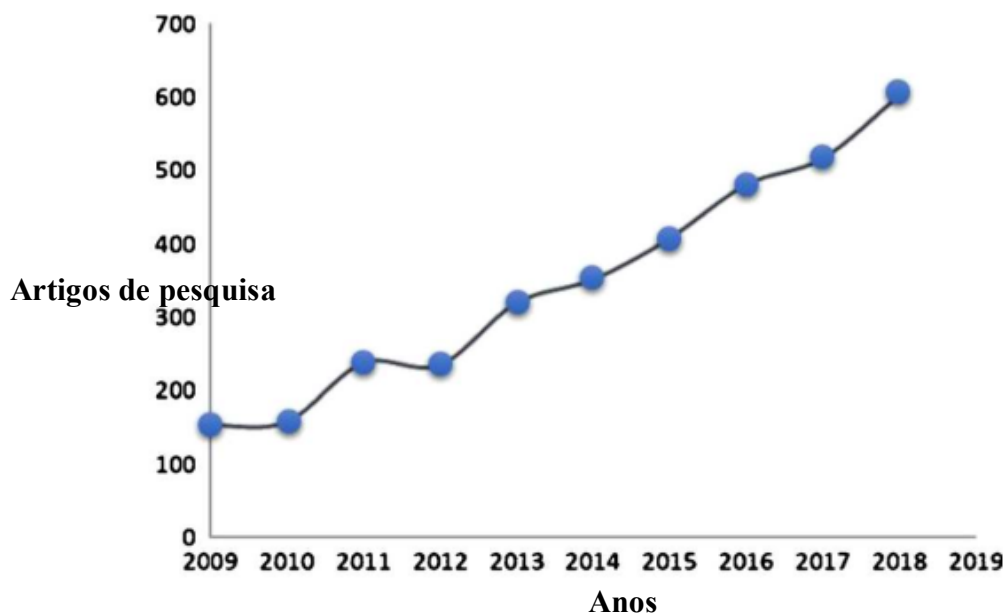


Figura modificada da referência [7]

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) está encontrando cada vez mais uso em sensores eletroquímicos e biossensores, tanto em sua caracterização, inclusive durante fases sucessivas de construção do sensor, quanto em aplicação como técnica de determinação quantitativa. Espera-se que esta tendência continue, ao mesmo tempo em que se utiliza melhor todas as informações fornecidas pela análise completa dos espectros de impedância [8, 9].

A saxitoxina (STX), pertence à classe das toxinas PSP (do inglês, paralytic shellfish poisoning) que pode ser traduzida como “veneno paralisante de molusco”, uma síndrome neurotóxica resultante da ingestão de moluscos contaminados. A STX é uma ficotoxina potencialmente tóxica, que pode levar à dormência de órgãos, paralisia muscular, dificuldades respiratórias e até morte em humanos. Pode ser acumulado por moluscos e peixes contaminados que se alimentam de algas tóxicas e, assim, entrar na cadeia alimentar. Portanto, é de grande importância detectar a STX com precisão em água potável e frutos do mar para reduzir os riscos potenciais de envenenamento [10].

Na Lagoa do Peri, localizada na ilha de Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina, no Brasil, populações crescentes de *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Raphidiopsis raciborskii*) que produzem saxitoxinas (STXs), têm sido detectadas desde 1994, colocando em risco o uso de suas águas que abastecem uma população de cerca de 100.000 habitantes [11].

Os métodos tradicionais de detecção de toxinas encontram muitas limitações, como procedimentos complicados, baixa sensibilidade e especificidade, entre outros. Os sensores de bioafinidade, entre eles os aptasensores, são dispositivos que vem chamando atenção nos últimos anos, sendo propostos como alternativa promissora para analisar toxinas em água e moluscos em amostras reais da cadeia alimentar [12].

Vários aptasensores eletroquímicos para detectar a STX tem sido desenvolvidos nesse último ano, por voltametria de pulso diferencial [10], utilizando análise de capacitância-tensão e capacitância constante [13, 14] e Park et al. [15] utilizaram um método de medição eletroquímica baseado em voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para construir um biossensor para STX.

Nesse contexto, o objetivo principal desta tese é desenvolver biossensores eletroquímicos baseados em APTs como elementos de bioreconhecimento para a detecção de STX utilizando a técnica de EIE. Conseqüentemente, os objetivos específicos são:

- Comparar diferentes métodos de limpeza para o eletrodo de trabalho e identificar o mais adequado para o aptasensor impedimétrico.
- Imobilizar duas sequências de APTs com três diferentes funcionalizações de tiol pelas técnicas de monocamadas automontadas (SAMs, do Inglês Self-assembling monolayers) e por drop-casting.
- Investigar a aderência do anti-incrustante 6-mercaptopexanol (MCH) no eletrodo de Au que contem os APTs imobilizados por SAM ou drop-casting.



- Avaliar a ligação da STX nos APTs imobilizados por SAM ou drop-casting por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).
- Distinguir a especificidade entre a detecção de Microcistina-LR (MCLR) e STX para diferentes concentrações das toxinas.

A tese proposta se justifica pelos seus aspectos inéditos e relevância científica. Nela, está incluída a pesquisa acadêmica, o caráter multidisciplinar e interdisciplinar, bem como o desenvolvimento tecnológico e científico, em particular, da eletroquímica aplicada aos biossensores. Além disso, contribui como parte da solução para uma problemática internacional e local.

Para fins metodológicos, esta tese foi dividida em cinco capítulos. Esse primeiro capítulo é de introdução à arte e objetivos. O segundo capítulo, de caráter teórico, apresenta os conceitos básicos sobre biossensores e sua classificação, APTs e técnicas de imobilização, bioincrustação e anti-incrustantes, cianobactérias e cianotoxinas e as técnicas eletroquímicas utilizadas. O terceiro capítulo, de caráter informativo, é destinado aos materiais e métodos utilizados, são apresentados a fabricação e limpeza do eletrodo de trabalho, as sequências dos APTs e sua imobilização, a construção dos dispositivos e detalhes dos compostos utilizados em cada etapa do aptasensor, bem como os pormenores da sua caracterização eletroquímica são relatados. O quarto capítulo, de caráter propositivo-argumentativo, é reservado à apresentação e discussão dos resultados. Ele está dividido em quatro partes, a primeira está dedicada a comparar métodos de limpeza no eletrodo de Au e identificar o mais adequado para o aptasensor impedimétrico. Na segunda parte é reservada aos resultados da imobilização dos APTs por SAM e drop-casting. Como terceira parte, os resultados da aderência do MCH são analisados. Na quarta parte a detecção de diferentes concentrações de STX é avaliada e aprimorada, bem como a especificidade na detecção com outra toxina. Finalmente, no quinto capítulo as conclusões do trabalho são apresentadas.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 BIOSENSORES

O uso de biossensores vem apresentando importância no campo de medicamentos, biomedicina, padrões de segurança alimentar, defesa, segurança, monitoramento ambiental, entre outras aplicações. Isso levou à construção de ferramentas analíticas precisas e poderosas, usando elementos de detecção biológica como os biossensores [16].

O primeiro biossensor “verdadeiro” foi desenvolvido pelo Bioquímico Leland C. Clark Jr. (Figura 2.1) em 1956. Leland Clark Jr., é amplamente reconhecido como um dos fundadores da área de biossensores e também conhecido como o “Pai dos biossensores” devido à sua invenção do eletrodo de oxigênio que leva seu nome: “eletrodo Clark” [17]. O professor Clark foi membro fundador do Conselho Editorial do renomado Jornal “Biosensors & Bioelectronics” e apoiou a revista desde o seu início em 1985 até sua triste partida [18].

Figura 2.1 O Professor Leland C. Clark Jr. (1918–2005) “Pai dos biossensores”



Figura retirada da referência [18]

O primeiro artigo publicado sobre um biossensor foi feito por Clark e Lyons em 1962, onde para medir a glicose em amostras biológicas utilizou a estratégia de detecção eletroquímica de oxigênio ou peróxido de hidrogênio usando glicose oxidase imobilizada num eletrodo. O termo “biossensor” foi introduzido pela primeira vez por “Cammann” em 1977. Esse termo “biossensor” refere-se a um dispositivo analítico poderoso e inovador envolvendo um elemento de detecção biológica com ampla gama de aplicações, dentre elas, diagnóstico,

segurança, biomedicina, e monitoramento ambiental [16, 19].

Segundo as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor é um dispositivo integrado com um receptor-transdutor independente, o qual é capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas seletivas usando um elemento de reconhecimento biológico para detectar um analito [19, 20].

### **2.1.1 Princípio de operação dos Biossensores**

O princípio de operação de um biossensor envolve a detecção da molécula alvo (analito) na amostra, por parte do elemento de bioreconhecimento e sua transformação em outro tipo de sinal a partir do transdutor utilizado, que pode produzir um sinal óptico, eletroquímico ou de mudança na massa (piezoelétrico). O reconhecimento molecular corresponde, então, à interação específica e seletiva entre o elemento biológico, imobilizado no transdutor, e o analito através de uma associação tal como: substrato-enzima, anticorpo-antígeno, receptor-hormônio, etc. Essas interações maximizam a capacidade das biomoléculas de reconhecer uma única substância entre várias substâncias [19, 21].

Os dois componentes essenciais para o funcionamento e bom desempenho de um biossensor são: primeiro, o elemento bioreceptor, que integra o elemento de reconhecimento biológico, tal como anticorpos, DNA, enzimas e componentes celulares de sistemas vivos; em segundo lugar, o elemento transdutor, uma peça chave no biossensor, com o papel principal de converter o evento de bio-reconhecimento (interações que ocorrem entre o elemento biológico e o analito de interesse) num sinal detectável e mensurável [19].

O valor do sinal gerado deve ser proporcional à concentração do analito, permitindo tanto medições quantitativas e qualitativas no tempo. O elemento de bioreconhecimento transmite a seletividade que permite ao sensor responder seletivamente a um analito específico ou grupo de analitos, evitando assim interferências de outras substâncias [21]. Consequentemente, um elemento de bioreconhecimento altamente seletivo e sensível é essencial para o desenvolvimento de um sensor eficiente [1]. Uma representação esquemática de um biossensor é mostrada na Figura 2.2.

Figura 2.2 Componentes gerais de um biossensor

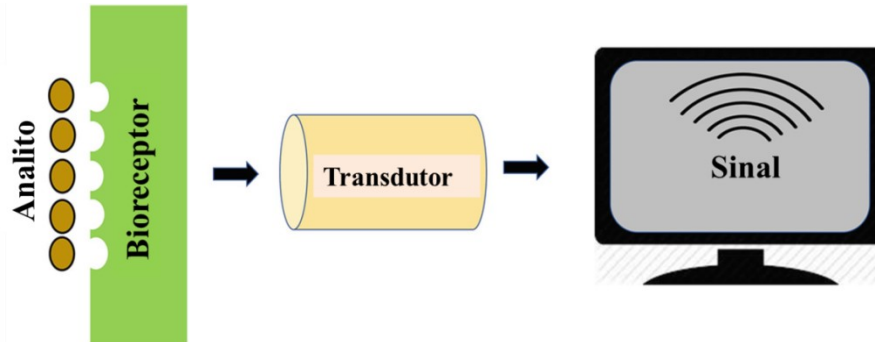


Figura modificada da referência [19]

### 2.1.2 Biossensores: vantagens e aplicações

Em comparação com as metodologias analíticas convencionais, os biossensores oferecem benefícios significativos, como possibilidade para miniaturização, capacidade de diagnóstico em tempo real, alta sensibilidade e especificidade, preparação mínima de amostra, alto rendimento e potencial para a portabilidade [21, 22]. As vantagens que os biossensores fornecem, como custo-efetividade e testes de diagnósticos no ponto de atendimento (POC point-of-care) os tornam cada vez mais atraentes para pesquisas focadas em análises clínicas e segurança alimentar para fins de controle ou monitoramento de doenças [16, 22]. A Figura 2.3 apresenta um esquema das vantagens dos biossensores.

Figura 2.3 Vantagens dos biossensores

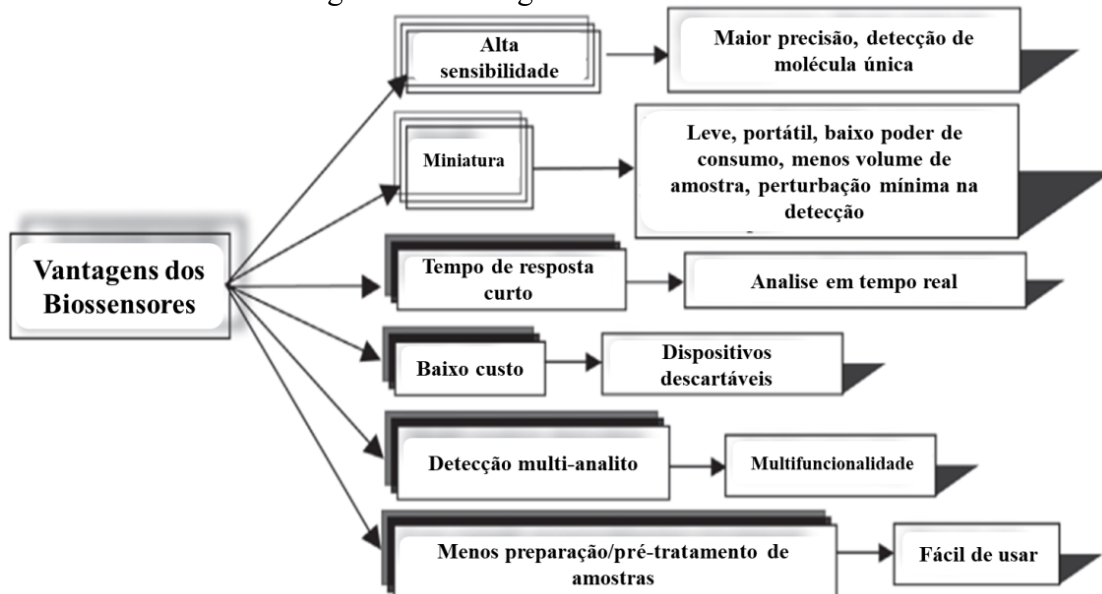


Figura modificada da referência [4]

Os biossensores apresentam inúmeras aplicações promissoras em vários campos, como monitoramento ambiental, diagnóstico médicos, detecção de microrganismos patogênicos, controle da qualidade de água e alimentos, defesa, etc [1, 16]. Dispositivos biossensores são importantes no monitoramento de diversos contaminantes, garantindo a qualidade da água potável, dos alimentos e do solo [19]. Ademais, os biossensores possuem o potencial de detectar contaminantes em baixa concentração na amostra, o que é uma questão prioritária para a proteção ambiental e prevenção de doenças [22]. A detecção desses contaminantes, como poluentes químicos e perigosos, detecção de drogas e detecção de toxinas em alimentos, água e ecossistemas do solo são algumas aplicações onde os biossensores são usados regularmente [19]. A Figura 2.4 mostra as inúmeras aplicações que possuem os biossensores.

Figura 2.4 Diferentes aplicações dos biossensores.

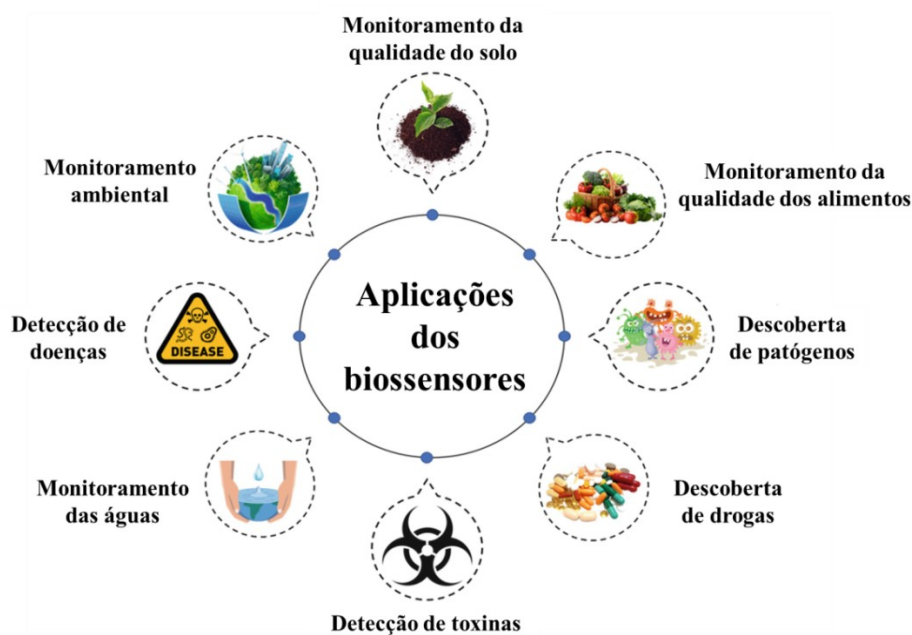


Figura modificada da referência [19]

Avanços recentes na tecnologia de DNA recombinante levaram ao desenvolvimento de biossensores baseados em DNA ou APTs que atuam como uma ferramenta de diagnóstico em avaliação clínica [23]. O uso desses APTs ou nucleotídeos fornecem ferramentas para desenvolver biossensores inovadores em relação aos métodos clássicos [16].

### 2.1.3 Classificação dos biossensores

A classificação de biossensores é um campo diversificado e multidisciplinar. Vários critérios estão envolvidos na classificação de biossensores e um esboço do esquema de classificação é mostrado na Figura 2.5 [1].

Figura 2.5 Classificação de biossensores baseados em vários bioreceptores e transdutores usados.

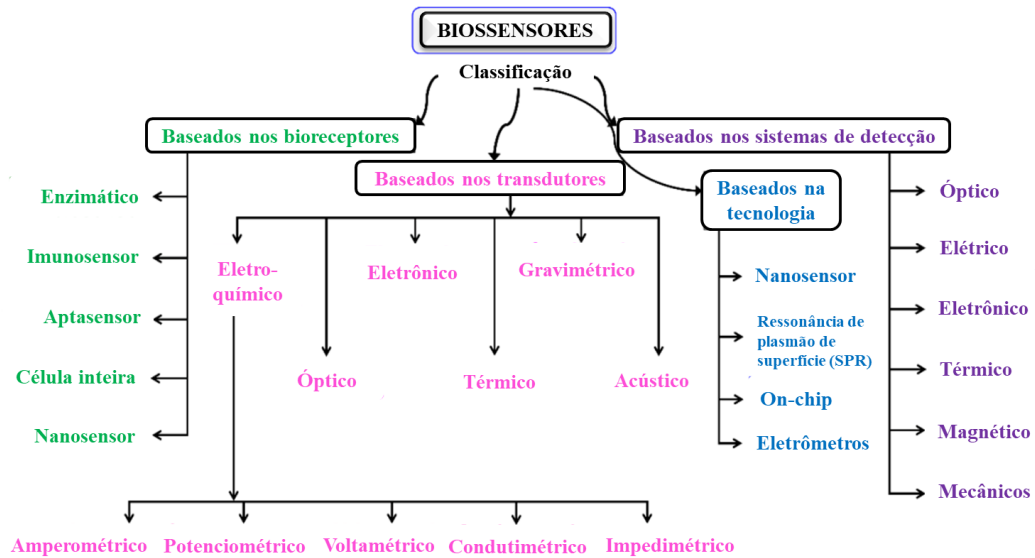


Figura modificada da referência [1]

Normalmente, os biossensores são classificados de acordo com o componente biológico utilizado, como enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos ou células, ou pelo tipo de transdutor, em eletroquímico, óptico, massa ou piezoelétrico. O elemento de reconhecimento biológico atua como uma ponte entre o elemento transdutor do sinal e o analito de interesse. Outro método de classificação dos biossensores está relacionado com o modo de interação do conjunto bioreceptor-analito, podendo ser divididos em dois tipos: biossensores catalíticos, no qual as interações resultam na formação de um novo produto de reação bioquímica, e biossensor de afinidade, no qual as interações resultam na ligação do analito na superfície do transdutor [21].

Os bioreceptores são um dos principais componentes na construção dos biossensores e podem ser classificados em: biossensores enzimáticos (classe mais comum), imunossensores (possuem alta especificidade e sensibilidade e são especificamente úteis no diagnóstico), biossensores baseados em ácido nucleicos ou aptâmeros (possuem alta especificidade com analitos) e biossensores de células. Na classificação feita com base no transdutor os biossensores são categorizados como eletroquímicos (que é ainda pode ser subdividido em

potenciométrico, amperométrico, impedimétrico e condutométrico), biossensores eletrônicos, térmicos, ópticos e de massa ou gravimétrico. Algumas classificações são feitas dependendo do sistema de detecção (óptico, elétrico, eletrônico, térmico, mecânico e magnético) e da tecnologia (nano, ressonância plasmônica de superfície (SPR), biossensores em chip (lab-on-chip), eletrômetros, e implantável) [1].

## **2.2 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Os biossensores eletroquímicos vêm se tornando muito populares e amplamente usados devido ao seu processo de bio-interação e detecção. A necessidade de um dispositivo que possibilita realizar análises altamente sensíveis, específicas e rápidas, em sinergia com a precisão nas medições analíticas, proporcionou o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos como uma nova ferramenta de detecção em diferentes áreas do conhecimento e setores de produção [24].

Os biossensores eletroquímicos vêm sendo atualmente desenvolvidos e fabricados devido à sua crescente demanda em diversas áreas de pesquisas, em destaque no campo ambiental, agrícola, clínica e industrial. Nos últimos anos, os biossensores eletroquímicos vêm sendo uma ferramenta proposta para identificação de diversas doenças, devido às suas características como baixo custo, sensibilidade, seletividade e resposta rápida [22]. Uma história de sucesso dessa classe de dispositivo foi a descoberta do glicosímetro utilizando biossensores à base de glicose oxidase, sendo a primeira na linha de biossensores eletroquímicos. Os biossensores de glicose são amplamente utilizados em hospitais e clínicas de diagnóstico, uma vez que apresentam propriedades essenciais para o monitoramento contínuo do nível de glicose no sangue de pacientes diabéticos [16].

Os biossensores eletroquímicos são constituídos por um sistema de detecção biológico e um transdutor eletroquímico. Esses dispositivos são utilizados para investigar e detectar mudanças de sinais-respostas relacionadas às interações que acontecem na interface da matriz do sensor. Nestes biossensores o elemento de reconhecimento biológico (anticorpos, enzimas, tecidos, DNA/RNA, aptâmeros ou outras biomoléculas) interage seletivamente com o analito de interesse, sendo o sinal elétrico resultante desta interação, transmitido ao processador de sinal pelo transdutor. O sinal medido é amplificado e registrado/salvo por um dos componentes do dispositivo (o sistema eletrônico) [22].

Os biossensores eletroquímicos combinam o potencial analítico das técnicas eletroquímicas com a elevada especificidade do evento de reconhecimento biológico

característicos dos biossensores. A bioreação que ocorre no eletrodo produz um sinal elétrico relacionado com a concentração do analito. Para esse propósito, um elemento bioespecífico é imobilizado na superfície ativa do eletrodo, convertendo a informação de bioreconhecimento em um sinal-resposta semi-quantitativa ou quantitativa. A Figura 2.6 ilustra uma representação esquemática do princípio básico de funcionamento e detecção de biossensores eletroquímicos. Nestes dispositivos, as reações biológicas produzem uma alteração no sinal elétrico, que pode ser por condutância, impedância, corrente ou acumulação de carga, e que podem ser detectados e medidos a partir dos respectivos biossensores eletroquímicos condutométricos, impedimétricos, amperométricos, ou potenciométricos. As reações investigadas são detectadas nas proximidades da superfície do eletrodo. O tipo de técnica eletroquímica utilizada na detecção é escolhida com base nas características envolvidas em cada caso específico da superfície de eletrodo [25].

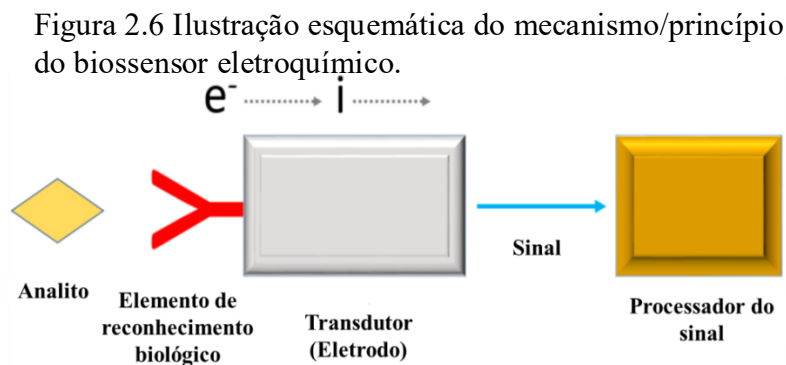


Figura modificada da referência [24]

As técnicas eletroquímicas envolvem normalmente o uso de três eletrodos, o eletrodo de referência, o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho. Os eletrodos de referência utilizados são mantidos a uma distância fixa do local da reação para manter um potencial estável. O eletrodo de trabalho, que corresponde à peça crucial a ser selecionada para medidas eletroquímicas, atua como o elemento de transdução na reação bioquímica, e finalmente o contra-eletrodo, que estabelece o contato entre a solução eletrolítica e a superfície do eletrodo para aplicar corrente ao eletrodo de trabalho[25].

O objetivo de investir na tecnologia dos biossensores deve-se ao fato desses dispositivos serem ferramentas que podem proporcionar benefícios significativos em relação aos métodos convencionais existentes. Entre as vantagens, destaca-se a miniaturização do



eletrodo de trabalho utilizado no biossensor eletroquímico, que favorece a redução de volumes de amostra no desenvolvimento do biossensor [24].

### 2.2.1 Classificação baseada na forma de transdução

Dependendo do modo de transdução, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como:

#### 2.2.1.1 Biossensores potenciométricos

O monitoramento dos potenciais no eletrodo indicador em relação ao eletrodo de referência, enquanto muda a concentração do analito é o princípio de um biossensor potenciométrico. Esses biossensores detectam a acumulação de carga criada pela ligação seletiva na superfície do eletrodo [26].

#### 2.2.1.2 Biossensores condutimétricos

Sensores desse tipo medem o efeito das mudanças biológicas e químicas sobre a condutância entre um par de eletrodos metálicos numa solução bulk, como consequência da imobilização e interação de biomoléculas [27].

#### 2.2.1.3 Biossensores amperométricos

Estes dispositivos medem mudanças na corrente no eletrodo de trabalho devido à oxidação/redução dos produtos de uma reação bioquímica em sistemas de medição. O primeiro e mais famoso biossensor amperométrico foi o desenvolvido para medir o nível de glicose no sangue de diabéticos. Um protótipo comercial desse biossensor eletroquímico baseado na glicose oxidase é mostrado na Figura 2.7 [28, 29].

Figura 2.7 Monitor digital de glicose com tira de teste e curva de conforto.

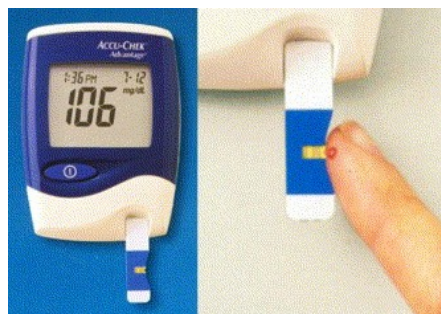


Figura retirada da referência [29]

### 2.2.1.4 Biossensores Impedimétricos

Têm como característica principal utilizar a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para monitorar a interação entre os elementos de bioreconhecimento imobilizados na superfície de um eletrodo e os analitos alvo, que podem ser usados para determinar respostas quantitativas de parâmetros eletroquímicos [30].

Nos últimos anos, a técnica de EIE vem sendo amplamente considerada no campo dos biossensores. EIE é uma técnica poderosa, minimamente invasiva, que pode ser usada para estudar as propriedades elétricas na interface do dispositivo [31].

Ao contrário dos sistemas amperométricos e potenciométricos, os biossensores de impedância permitem a detecção direta de eventos de reconhecimento biomolecular sem o uso de marcadores, também conhecidos na literatura como biossensores “label free”. Em biossensores impedimétricos é necessário um bioreceptor único que se liga especificamente ao analito, como DNA/RNA, anticorpos, aptâmeros (APTs), entre outros [30, 32]. Uma representação esquemática do funcionamento de um biossensor com base na técnica de EIE é mostrada na Figura 2.8.

Figura 2.8 Esquema geral explicando o princípio de funcionamento de um biossensor impedimétrico, antes e depois da ligação do analito.

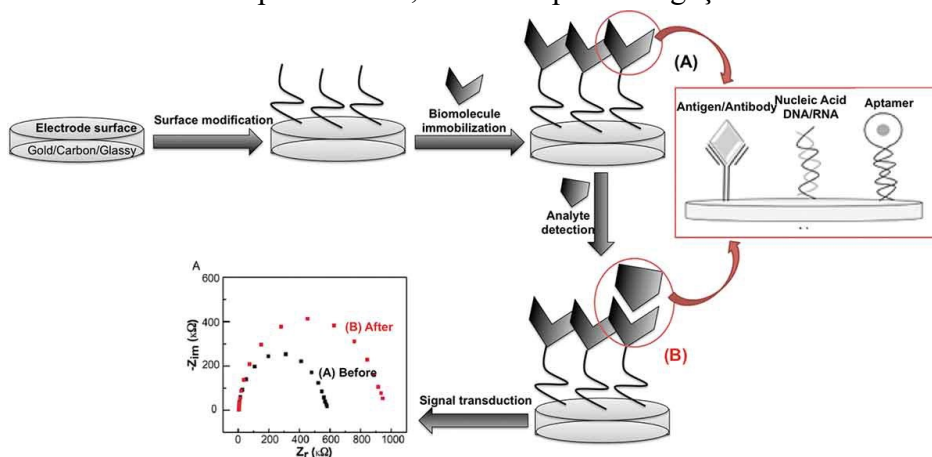


Figura retirada da referência [31]

No caso dos biossensores impedimétricos, a impedância eletroquímica consiste numa parte resistiva e outra capacitiva como resultado de uma interação com um sinal de tensão CA de pequena amplitude em seu eletrodo de detecção para medir a resposta de corrente como uma função da frequência. A natureza elétrica dos biossensores de impedância possibilita que eles sejam desenvolvidos em sensores portáteis para monitoramento ambiental [32, 33]. Por

essas razões, dentre os biossensores, aqueles livre de marcadores são dispositivos promissores para diferentes aplicações [31].

### **2.2.2 Classificação baseada na forma de bioreconhecimento**

Em termos da natureza do processo de bioreconhecimento, especificamente do modo de interação do conjunto bioreceptor-analito, existem duas categorias de biossensores eletroquímicos:

#### **2.2.2.1 Biossensores catalíticos**

Biocatalisadores, tais como enzimas, células ou tecidos, são usados para moderar uma reação bioquímica, reconhecer, ligar, quantificar e converter quimicamente uma molécula [34].

#### **2.2.2.2 Biossensores de afinidade**

Também conhecidos como biossensores não catalíticos, baseiam-se na utilização de moléculas receptoras, como anticorpos, ácidos nucleicos, aptâmeros (APTs) e receptores de membrana para reconhecer e se ligar num determinado alvo. A alta especificidade e afinidade das reações de ligação bioquímica (tais como a hibridização do DNA ou o complexo anticorpo-antígeno) conduzem a dispositivos de detecção altamente seletivos e sensíveis [35].

Biossensores baseados em biomoléculas podem mudar entre duas ou mais conformações em resposta à ligação de um alvo específico. Eles vêm sendo aplicados para a determinação de uma ampla gama de analitos relevantes (ácidos nucleicos, proteínas, e toxinas). Biossensores por afinidade são adequados para detecção em tempo quase real do evento de ligação ao alvo específico de interesse, diretamente na amostra, usando instrumentação apropriada e compatível [36]. Na Figura 2.9 mostram-se três tipos de biossensores por afinidade com diferentes biomoléculas receptoras e as respectivas respostas para alvos específicos.

Os aptâmeros (APTs) são bioreceptores sintéticos formados por uma sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA) ou ácido ribonucleico (ARN ou RNA) que possuem elevada afinidade com o analito específico. Biossensores baseados em APTs, conhecidos como aptasensores são classificados em ópticos, eletroquímicos, entre outros com base no modo de transdução do sinal [23, 37].

Figura 2.9 Exemplos de aplicações de biossensores por afinidade para a determinação de um analito específico. a) Biossensor baseado num aptâmero para ampicilina b) Biossensor eletroquímico baseado num peptídeo para anticorpos c) Biossensor íon eletroquímico baseado numa sonda de DNA.

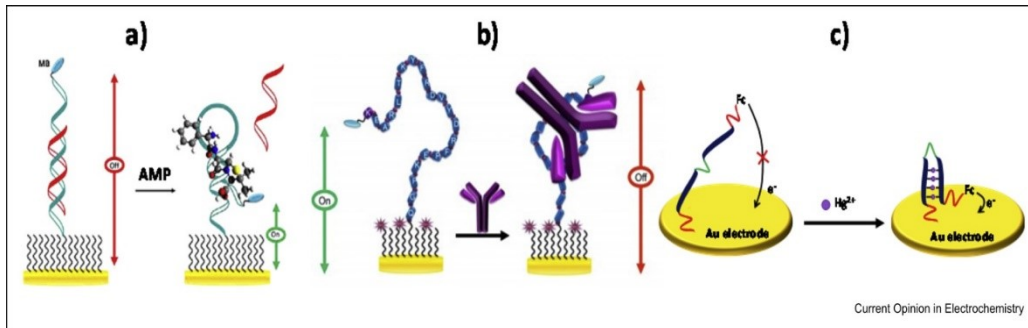


Figura retirada da referência [36]

Um biossensor eletroquímico baseado em aptâmero (APT), ou seja, um aptasensor eletroquímico utiliza o APT como elemento de bioreconhecimento e usa um transdutor que converte a interação de reconhecimento entre o ATP e o analito específico em um sinal elétrico para a medição quantitativa ou semi-quantitativa de concentrações de analito [38].

As primeiras aplicações envolvendo APTs aconteceram em 1996, onde foram desenvolvidos aptasensores ópticos com marcadores de fluorescência. A integração das características do APT com as propriedades dos sistemas eletroquímicos que incluem elevada sensibilidade e seletividade, miniaturização, baixo custo, capacidade de integração com nanomateriais, e aplicações no ponto de atendimento (PoC, do inglês point of care), tornaram os aptasensores eletroquímicos excelentes candidatos em diversas aplicações. Em 2004, um aptasensor amperométrico do tipo sanduíche foi elaborado para construir um sensor para glicose. Desde então, aptasensores eletroquímicos vêm sendo usados para o monitoramento da saúde, segurança alimentar e controle ambiental [37].

Aptasensores que utilizam a técnica de EIE, também chamados de aptasensores impedimétricos, vêm sendo utilizados para detectar toxinas [39], pesticidas [40] e para diagnóstico médico [41]. Na Figura 2.10, observa-se a classificação de biossensores segundo o bioreceptor, transdutor e a técnica eletroquímica de detecção utilizada, destacando-se em um retângulo em verde os elementos utilizados neste trabalho; onde foram desenvolvidos aptasensores impedimétricos para a detecção de uma neurotoxina.

Figura 2.10 Diagrama esquemático de um biossensor típico que consiste num bioreceptor, transdutor, sistema eletrônico e display e vários tipos de bioreceptores e transdutores usados nos biossensores também são mostrados.

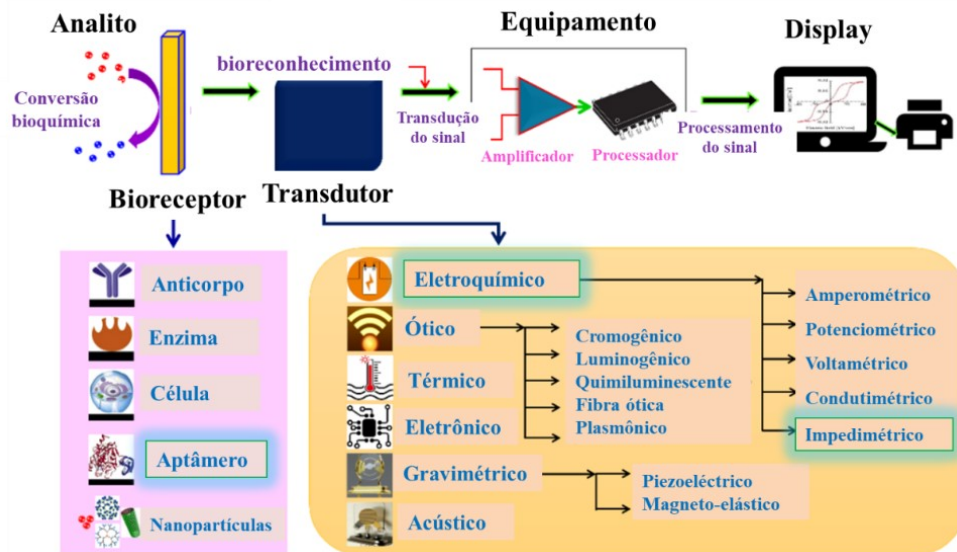


Figura modificada da referência [1]

### 2.3 Aptâmeros (APTs)

Os APTs são seqüências de oligonucleotídeos de DNA ou RNA (aproximadamente 12-80 nucleotídeos) de fita simples (single stranded ssDNA), que se ligam com alta sensibilidade, especificidade e afinidade com seus alvos. O termo ‘aptâmero’ (APT) deriva do Latim ‘aptus’ (ajuste, adaptar-se) e da palavra grega ‘meros’ (parte ou seção) e apresentam características de ligação distinta com seus alvos, tal como a capacidade de dobrar-se em várias conformações terciárias [42]. Na Figura 2.11, mostra-se um panorama das conformações de APTs e seus receptores.

Figura 2.11 Visão geral conformacional e interacional de APTs e seus receptores: A. A conformação sequencial e a estrutura secundária do APT comercializado Macugen. B. Ilustração esquemática e modelo molecular do DNA quádruplo para um APT. C. Estrutura do APT C13 de RNA e seu receptor GRK2.

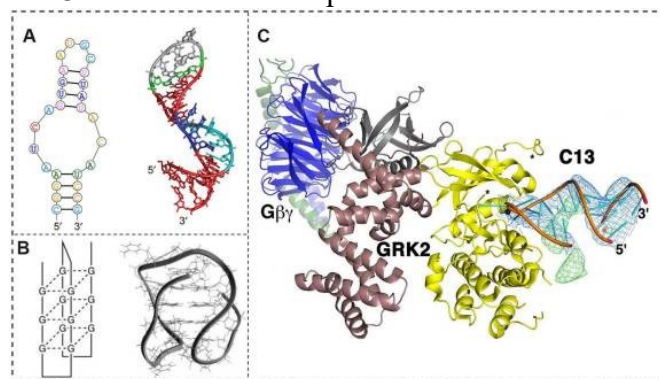


Figura retirada da referência [43]

Em 1990, Tuerk et al. obtiveram a primeira sequência de RNA para ligação com o DNA da polimerase do bacteriófago T4. Independentemente Ellington et al. rastream a sequência de RNA com afinidade para um corante orgânico, e foi ele quem cunhou o termo “aptâmero”. Em 1992, Bock et al. obtiveram pela primeira vez os APTs de DNA de fita simples para a trombina [44].

Teoricamente, APTs podem ser selecionados para qualquer alvo por um procedimento combinatório denominado evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX - do Inglês systematic evolution of ligands by exponential enrichment) e sintetizados em grande quantidade in vitro de forma bastante reprodutível [45].

Os APTs de ácido nucleico, também chamados "anticorpos químicos", oferecem algumas vantagens quando comparados aos anticorpos tradicionais, incluindo seu tamanho relativamente pequeno, estrutura flexível, produção química rápida, modificação química multifuncional, e alta estabilidade. Algumas outras vantagens dos APTs como receptores de bioreconhecimento comparados com os anticorpos são [46]:

- Os APTs são preparados pelo procedimento de seleção in vitro; enquanto a produção de anticorpos necessita de experimentos em animais;
- APTs podem ser desenvolvidos com elevada afinidade e especificidade para compostos de baixo peso molecular, como a maioria das toxinas; trabalho que resulta mais complicado para os anticorpos.
- As sequências de APTs podem ser seletivas para diferentes partes da molécula alvo.
- Uma vez identificada a sequência do APT, ela pode ser sintetizada com alta pureza, reprodutibilidade e custo relativamente baixo; ao contrário dos anticorpos que precisam de animais experimentais, e por causa disso sofrem na reprodutibilidade lote a lote.
- Os APTs podem ser facilmente modificados quimicamente por diversos grupos químicos funcionais, que possibilitam a imobilização de APTs para vários suportes sólidos;
- Por último, os APTs também são altamente estáveis em diferentes condições de temperatura e desnaturação.

Devido a essas vantagens, os APTs como receptores específicos estão emergindo como uma alternativa promissora aos anticorpos, devido à sua utilização como agentes de

captura para aplicações em dispositivos biossensores. Aptasensores têm sido projetados usando diferentes estratégias, particularmente a mudança de conformação do APT após a ligação com o alvo. Além disso, a ligação dos APTs aos seus ácidos nucleicos complementares pode ser explorada em esquemas de detecção. Os alvos dos APTs incluem proteínas, enzimas, nucleotídeos, íons metálicos, toxinas, células inteiras, corantes orgânicos, entre outros [47]. A Figura 2.12 mostra a comparação do tamanho e do peso molecular entre o APT e o anticorpo.

Figura 2.12 Comparação do peso molecular (PM) e do tamanho físico entre o aptâmero (APT) (esquerda) vs anticorpo (direita). PM: 5-15kDa vs 150-1000kDa, Tamanho(diâmetro): 2-3nm vs. 12-15nm

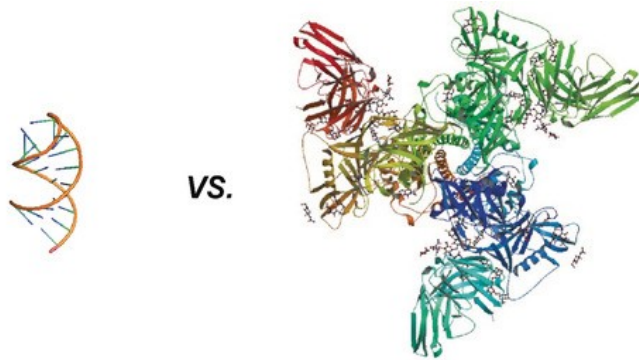


Figura retirada da referência [48]

Desde seu desenvolvimento, os APTs se tornaram um tipo promissor de elemento de reconhecimento molecular, desempenhando um papel significativo em diversos campos, dentre eles, monitoramento ambiental, análise biológica, segurança alimentar, diagnósticos clínicos e agentes terapêuticos [49]. Em dezembro de 2004, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou a primeira aplicação terapêutica baseada em APTs, com o Macugen-Pegaptanibe (Pfizer/Eyetech), sendo um APT de RNA modificado (Ver a Figura 2.11 A), o APT de fator de crescimento endotelial vascular, para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade [50]. Recentemente, os APTs de ácido nucléico foram confirmados para serem úteis como medicamentos e sondas de diagnóstico para COVID-19 e o SARS-Cov-2 respectivamente [51].

Os APTs são capazes de integrar com proteínas ou moléculas pequenas, incluindo partículas virais intactas, toxinas, anticorpos e enzimas. Os APTs apresentam características importantes como vida útil longa, fáceis de funcionalizar possibilitando sua ligação na

superfície dos eletrodos, variação menor de lote a lote, custo-benefício e pouca tendência à desnaturação [23].

Os APTs são estáveis termicamente e resistentes à desnaturação e degradação, especialmente aqueles de DNA, e sua afinidade e especificidade de ligação podem ser otimizadas por técnicas de evolução molecular. Além disso, os APTs podem também ser sintetizados quimicamente, modificados (usando diferentes grupos funcionais) e imobilizados em muitas superfícies eletródicas, resultando em camadas receptoras altamente ordenadas. Essas características categorizam os APTs como uma excelente escolha para sua utilização como elemento de reconhecimento no desenvolvimento de dispositivos biossensores [25].

Na literatura grupos de biotecnologia têm desenvolvido os APTs específicos para toxinas, por exemplo, para ácido Ocadaico (AO) [52], Ocratoxina A (OTA) [53], em especial para cianotoxinas, temos para Microcistina-LR (MCLR) [54, 55], Anatoxina-a (ATX) [56], Cilindrospermopsina (CYN) [57] e para Saxitoxina (STX) [58, 59].

### **2.3.1 Integração dos APTs em biodeteção**

A plataforma de detecção eletroquímica baseada em APTs é uma técnica de biodeteção promissora por causa de suas vantagens, que abrangem custo-benefício, facilidade de uso e simplicidade operacional, que torna esses biossensores ideais para o monitoramento de uma ampla gama de analitos de interesse. Por causa da combinação dessas características, diversas pesquisas fazendo uso de aptasensores eletroquímicos vêm sendo estabelecidas e amplamente empregadas para aplicações relacionadas a diagnósticos clínicos, pesquisa biomédica, monitoramento ambiental e análise de alimentos [60].

A imobilização do APT na superfície do transdutor é uma etapa determinante para o desempenho do aptasensor obtido. As abordagens mais comuns para garantir a cobertura do APT sobre a superfície do eletrodo de maneira estável, mantendo ao mesmo tempo a afinidade de ligação do mesmo na solução, incluem: quimissorção dos APTs funcionalizados com o grupo tiol sobre a superfície de um eletrodo de ouro; ligação do APT funcionalizados com biotina sobre as superfícies de sensores modificadas com avidina; imobilização dos APTs funcionalizados com terminação amina por acoplamento do grupo amina aos grupos carboxila, entre outros. Os espaçadores são normalmente usados para permitir flexibilidade suficiente e liberdade conformacional para o APT, além disso podem proporcionar uma distância apropriada entre a parte de reconhecimento do APT e o eletrodo, e assim contribuir positivamente para ligação ao analito de interesse [61].



Múltiplas técnicas de imobilização de APTs foram desenvolvidas nos últimos anos: interações estreptavidina-biotina, eletrodeposição e quimissorção, entre outras. A maioria das abordagens de imobilização é baseada na quimissorção de tióis (R–SH), dissulfetos (R–S–S–R) e sulfetos (R–S–R) sobre superfícies metálicas, como ouro (Au), prata ou cobre, onde R representa um grupo de átomos contendo carbono. Os grupos que possuem enxofre presentes na solução são adsorvidos espontaneamente na superfície do metal, formando uma monocamada molecular organizada e orientada [62]. Na Figura 2.13, pode-se observar as estruturas moleculares e dimensões de diferentes tipos de tióis.

Figura 2.13 Estrutura de um ditiol aromático ( $C_{16}H_{26}OS_2$ ) e dois monotióis, decano-1-tiol ( $C_{10}H_{22}S$ ) e octadecano-1-tiol ( $C_{18}H_{38}S$ ). Os átomos de enxofre, carbono, hidrogênio e oxigênio são representados por esferas amarelas, cinzas, brancas e vermelhas, respectivamente.

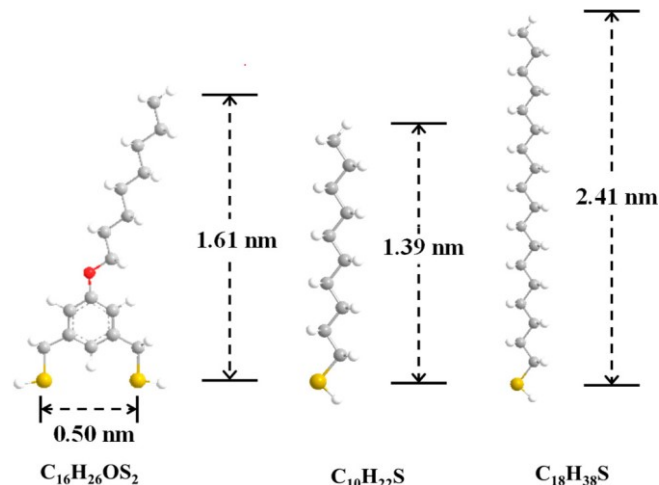


Figura retirada da referência [63]

Outros substratos usados como eletrodos de trabalho na construção de aptasensores eletroquímicos são o carbono de vidro (GC, glass carbon), o óxido de índio estanho (ITO, indium tin oxide), o carbono impresso (SPC, screen-printed carbon), etc [60]. A Figura 2.14 mostra os diferentes analitos detectados no monitoramento da indústria alimentar e água, assim como, os substratos empregados como eletrodos de trabalho e técnicas eletroanalíticas utilizadas nos aptasensores eletroquímicos, destacando-se num retângulo em vermelho os elementos utilizados nessa pesquisa.

Figura 2.14 Analitos detectados na análise de alimentos e água, bem como os eletrodos e técnicas eletroanalíticas utilizadas nos aptasensores eletroquímicos, destacando-se num retângulo em vermelho os elementos utilizados nessa pesquisa.

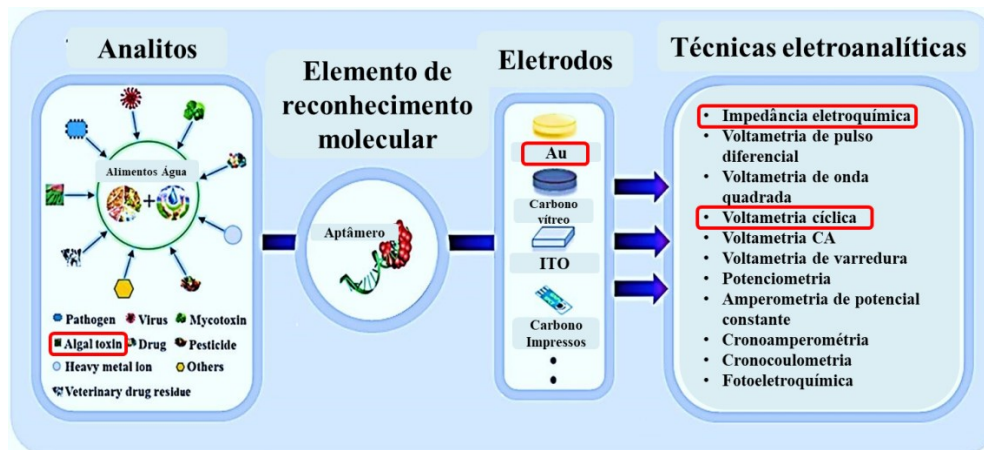


Figura modificada da referência [60]

### 2.3.2 Técnicas de imobilização do APT

A etapa de imobilização do APT sobre a superfície do eletrodo de trabalho é um processo crucial no desenvolvimento de um aptasensor eletroquímico. Os métodos de imobilização mais comumente usados no desenvolvimento de aptasensores eletroquímicos incluem a formação de ligações covalentes, reações de afinidade e automontagem [64].

Os APTs podem ser imobilizados diretamente sobre a superfície do eletrodo, ou a superfície pode ser primeiramente funcionalizada para permitir a fixação de quantidades adequadas de APT. O pequeno tamanho dos APTs é um fator favorável para a imobilização em monocamadas, especialmente em dispositivos miniaturizados como biossensores. [61, 62]. Entre muitas técnicas de imobilização dos APTs, existem duas muito simples utilizadas nesse trabalho:

#### 2.3.2.1 Monocamadas automontadas (SAM)

Para o crescimento de monocamadas automontadas (SAMs, do Inglês Self-assembling monolayers) organizadas, orientadas e estáveis, uma alternativa eficaz é utilizar um grupo tiol para o ancoramento de moléculas biológicas sobre a superfície do eletrodo de Au. A simplicidade de preparação, a alta reprodutibilidade e a possibilidade de utilizar diferentes grupos químicos funcionais, são características importantes das SAMs, que as categorizam como técnica de imobilização apropriada para ser usada na preparação de sensores químicos e biossensores [65].

O eletrodo de Au é uma excelente opção para a construção de aptasensores eletroquímicos por apresentar as seguintes características: elevada afinidade com o grupo tiol ( $R-SH$ ), devido à ligação  $Au-S$ ; as propriedades inertes e estruturas cristalinas bem definidas do Au, as quais influenciam favoravelmente na formação das SAMs. O mecanismo de formação das SAMs possui três etapas: a fisissorção, seguida pela quimissorção das moléculas e, finalmente, o processo de cristalização. A fisissorção é descrita pela atração do tipo van der Waals, entre a molécula e o substrato de Au, no momento em que se expõe a superfície do eletrodo aos tióis ( $R-SH$ ). Durante a quimissorção, o grupo da cabeça de enxofre perde o átomo de hidrogênio e se liga aos átomos de Au, formando uma forte ligação covalente. Finalmente, no processo de cristalização, conforme as moléculas vão se acomodando na superfície, a cobertura dos tióis cresce no eletrodo do Au, resultando em monocamadas altamente ordenadas e orientadas, como pode ser visto na Figura 2.15 [62].

Figura 2.15 Esquema das SAMs de um alcanotiol adsorvidas num eletrodo de Au. (A) SAMs de alcanotióis numa configuração em pé. Vermelho: átomo de S, azul: átomo de C, branco: átomo de H. (B) Configuração típica de um biossensor que consiste em APTs (em azul) funcionalizado com um grupo tiol em uma de suas extremidades e o anti-incrustante Mercaptohexanol (SOH) para preencher os espaços vazios deixados pelo APT e assim evitar ligações inespecíficas.

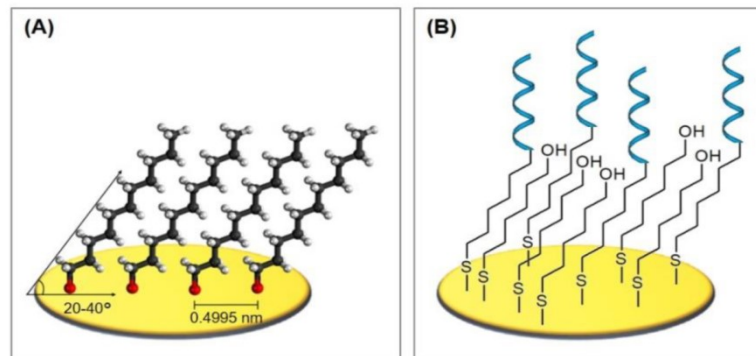


Figura retirada da referência [62]

### 2.3.2.2 Filmes por drop-casting

A busca por biossensores eletroquímicos estimulou o estudo de uma diversidade de eletrodos modificados para obter elevada sensibilidade e seletividade. Uma abordagem interessante envolve a modificação das superfícies dos eletrodos com uma camada de partículas. A resposta eletroquímica de um biossensor em relação a algum alvo de interesse está relacionada com uma combinação da natureza do eletrodo e sua superfície modificada [66, 67].

A técnica de drop-casting (literalmente "moldagem por gota") pode ser também utilizada em análises eletrocatalíticas e técnicas de detecção eletroquímica. A técnica de drop-casting é simples, fácil, rápida e de baixo custo, sendo aplicada para a produção de filmes finos sobre a superfície do eletrodo [67, 68]. A maior vantagem desta técnica fundamenta-se no fato de que nenhum equipamento especial é necessário. O drop-casting envolve apenas uma simples transferência da solução para um substrato, ou seja, um volume do líquido contendo uma suspensão das partículas de interesse é depositado na superfície do eletrodo a ser modificado [67, 69]. Seguidamente o eletrodo passa por um processo de aquecimento para evaporar o solvente. A espessura do filme pode ser até certo ponto controlada pelo conteúdo sólido da solução, porém, para isso acontecer, certos parâmetros como a tensão superficial entre a solução e o substrato alvo, o volume, a concentração e viscosidade da solução, tanto quanto a temperatura de aquecimento (taxa de evaporação) terão grande impacto na qualidade e uniformidade do filme [69]. Além disso, os solventes voláteis são geralmente preferidos para esta técnica, os quais podem evaporar e se dispersar melhor no substrato, podendo melhorar a qualidade do filme. Por outro lado, existem algumas limitações de distribuição da solução no eletrodo por causa do gotejamento, gerando uma dificuldade em controlar a espessura e uniformidade do filme no eletrodo [66, 68]. Na Figura 2.16, pode-se apreciar as etapas de formação de um filme de uma suspensão por drop-casting.

Figura 2.16 Formação de um filme a partir de uma solução usando a técnica de drop-casting, passando das etapas de deposição, evaporação e secagem.

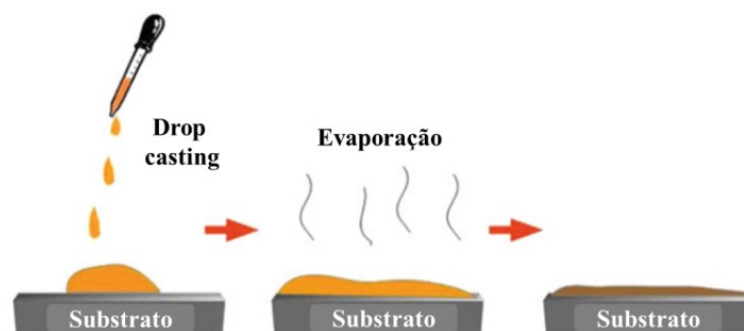


Figura modificada da referência [68]

Diferentes aptasensores eletroquímicos têm sido construídos sobre um eletrodo de Au, onde o APT foi imobilizado por SAMs, por exemplo, um aptasensor competitivo para brevetoxina [70], para enterotoxina um impedimétrico [71] e para saxitoxina um amperométrico [72], entre outros. A imobilização do APT sobre o eletrodo de Au pela técnica de drop-casting é menos utilizada, entre os poucos aptasensores eletroquímicos que utilizam

essa técnica, destacam-se dois impedimétricos, para microcistina-LR [73] e para saxitoxina [74], esse último é o trabalho que sustenta essa tese.

Apesar de que as técnicas de SAMs e drop-casting conseguem imobilizar os APTs nas superfícies dos eletrodos, em geral não conseguem cobrir totalmente a superfície, deixando espaços vazios que poderiam ser preenchidos com ligações inespecíficas dos alvos, por causa disso, é necessário utilizar compostos que cubram o resto da área do eletrodo e que também não interajam com os alvos, tais compostos são chamados de anti-incrustantes e serão descritos na próxima seção.

## **2.4 Bioincrustação e Anti-incrustantes**

A tecnologia dos biossensores eletroquímicos vêm sendo uma abordagem ativa na química analítica, podendo ser utilizada como ferramentas de diagnósticos rápidos para várias aplicações clínicas, biomédicas e na indústria. Dentro da química analítica, a técnica eletroquímica de detecção de superfície apresenta vantagens, em destaque o fácil processamento, o baixo custo, precisão e baixo limite de detecção. Além disso, necessita de apenas um pequeno volume de amostra para desenvolver as medições. Nos biossensores eletroquímicos o elemento de bioreconhecimento é imobilizado sobre a superfície do transdutor e a ligação seletiva desse bioreceptor com o analito produz um sinal elétrico relacionado com a concentração do analito. A resposta dos sinais elétricos geram problemas quando moléculas de bioincrustação se ligam à superfície do eletrodo por meio de ligações inespecíficas. Moléculas de bioincrustação tendem a se prender na superfície do eletrodo por meio de diferentes interações, como hidrofóbicas, eletrostáticas e intermoleculares, que interferem nas propriedades do eletrodo, podendo bloquear o bioreceptor e ainda o eletrodo. Desta forma, a seletividade e especificidade da ligação e interação do bioreceptor com o analito de interesse quando fortemente influenciadas pela camada de bioincrustação, podem afetar a confiabilidade no resultado analítico, a sensibilidade, a reprodutibilidade e o desempenho dos biossensores eletroquímicos. Portanto, é necessário projetar plataformas de detecção anti-incrustação que possam reduzir efetivamente as ligações inespecíficas indesejadas para garantir o bom desempenho do biossensor em análises eletroquímicas. A necessidade de detectar analitos de interesse em amostras reais tem estimulado o estudo de anti-incrustantes em biossensores eletroquímicos [75].

Para diversas aplicações torna-se necessário cobrir a superfície do eletrodo de trabalho com esses revestimentos anti-incrustantes, que são projetados para serem

biologicamente “inertes”; isto é, eles não produzem uma resposta imune ou reação química. Em outros termos o papel dos anti-incrustantes é inibir a ligação de incrustantes inespecíficos na superfície do transdutor. Os materiais anti-incrustantes inibem o ancoramento de moléculas de incrustações na superfície dos eletrodos por mecanismos que incluem interações hidrofílicas, repulsão estérica, repulsão eletrostática e baixa energia de superfície [75, 76]. A Figura 2.17 mostra os mecanismos de anti-incrustação.

Figura 2.17 Ilustração dos mecanismos de anti-incrustação e das propriedades anti-incrustantes na superfície de eletrodos.

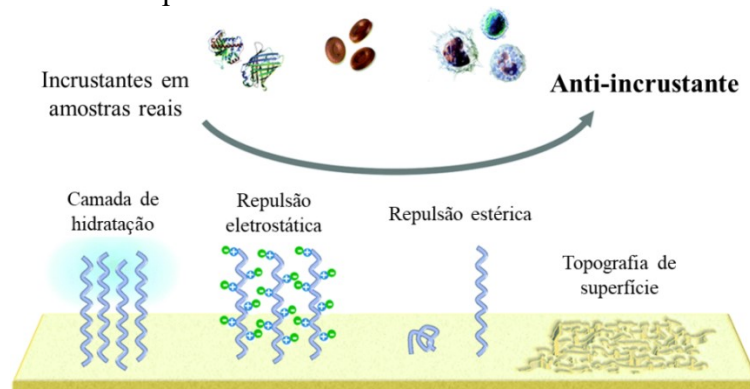


Figura modificada da referência [75]

Existem duas estratégias de modificação para aperfeiçoar a resistência à incrustação na superfície dos eletrodos em biossensores eletroquímicos, alterando a morfologia da superfície (física) e imobilizando o componente aditivo (químico) no eletrodo. Dentre as estratégias físicas encontram-se: a adsorção física, o revestimento mecânico (spin-coating, dip coating e spray coating), a criação de uma superfície superhidrofóbica ou uma estrutura nanoporosa, entre outras [75, 76]. Estratégias químicas como método de imobilização para a construção de superfícies anti-incrustantes são mais utilizadas em biossensores eletroquímicos, incorporando polímeros anti-incrustantes nos transdutores [75, 77]. Existem duas técnicas de construção da estrutura anti-incrustante: pincéis de polímero e SAMs. A técnica para revestimento com pincéis de polímero otimiza a ação anti-incrustação para imobilização do material. A técnica para a formação de uma estrutura de um polímero anti-incrustante por SAMs vêm sendo usado para construir superfícies de eletrodos em sistemas de detecção. Tal como explicado na formação de SAMs para os APTs na seção 2.3.2.1, a técnica envolve a formação espontânea de uma monocamada organizada e de espessura uniforme. Os alcanotióis para eletrodos de Au que fornecem a formação da monocamada são os tipos mais usados para esses biossensores eletroquímicos. O fácil acesso aos derivados de tiol com

grupos funcionais anti-incrustantes, e a preparação do processo de reação são características que justificam a utilização de SAMs formadas por tiol-Au [75, 76]. Na Figura 2.18, observa-se os métodos de construção para a formação de estruturas anti-incrustantes, destacando em retângulo rosa o método utilizado nesse trabalho.

Figura 2.18 Estratégias de materiais anti-incrustantes explorados nos eletrodos por meio de modificação química. Em retângulo rosa a estratégia utilizada nesse trabalho.

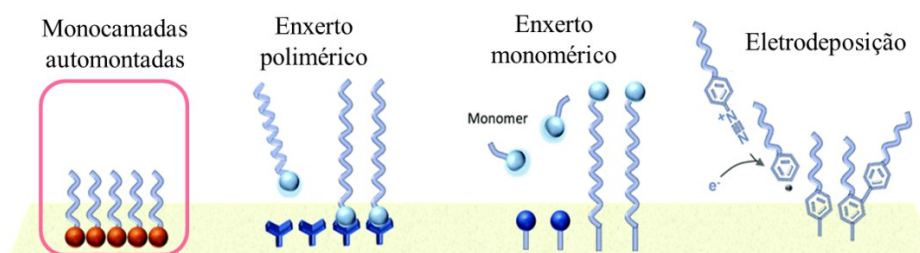


Figura modificada da referência [75]

Para auxiliar no arranjo de materiais tiolados, a superfície do eletrodo é imobilizada com um grupo cabeça de hidroxila para hibridização e solucionar a ligação não específica. Um exemplo de um componente de álcool tiolado de pequeno tamanho é o 6-mercaptopexanol (MCH), que ocupa os espaços vazios deixados pelos APTs na superfície do eletrodo de Au, impedindo ligações inespecíficas de pequenas moléculas e até do próprio analito na superfície do eletrodo, além de estabilizar a conformação das SAMs [75, 76].

A maioria dos APTs utilizados na elaboração dos biossensores eletroquímicos são funcionalizados em uma de suas extremidades com um grupo tiol (como o caso desse trabalho). No entanto, APTs tiolados não apenas se ligam à superfície de Au por meio de ligações Au-S, mas também podem ser ligados inespecificamente restringindo o acesso do analito aos APTs. Pode-se contornar o problema da ligação inespecífica com o auxílio de um anti-incrustante, por exemplo, o MCH, sendo subsequentemente adicionado ao eletrodo de Au [62]. Na Figura 2.15 (B) (Ver a seção 2.3.2.1) tem um esboço da estrutura APT/MCH.

Na literatura, existem inúmeros aptasensores impedimétricos para ficotoxinas que utilizam o MCH como anti-incrustante numa superfície de Au, entre outros temas, para o ácido ocadaico [52], para cilindrospermopsina [57], para anatoxina-a [56] e para saxitoxina [74], esse último é o trabalho no qual está baseado essa tese. Entre os poucos aptasensores para cianotoxinas que não utilizam um anti-incrustante numa superfície de Au, o autor tem só

conhecimento de um para microcistina-LR [73], nele uma concentração alta de APT foi utilizada, talvez para não precisar de um anti-incrustante.

## **2.5 Cianobactérias e cianotoxinas**

A maneira como gerenciamos nossos corpos d'água determina até que ponto as cianobactérias proliferam. Embora para alguns corpos d'água nas últimas décadas tenha havido algum progresso no controle das cargas excessivas de nutrientes que resultam em eutrofização (poluição de corpos d'água) e florescimento de cianobactérias, as pressões sobre muitos outros estão aumentando, por meio do crescimento populacional, da urbanização, das mudanças no uso da terra agrícola e do clima. O florescimento de cianobactérias foi reconhecido como uma preocupação ambiental desde que começou a ocorrer amplamente em muitos países na década de 1960. A consciência de sua importância para a saúde pública cresceu durante a década de 1980, à medida que sua toxicidade se tornou cada vez mais compreendida, incluindo como causa das mortes de rebanhos, animais de estimação e selvagens expostos, assim como casos de doenças humanas foram atribuídos à exposição de cianotoxinas após atividades recreativas ou consumo de bebidas de água [78].

Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu seu primeiro documento diretriz de água potável para uma toxina cianobacteriana de ampla ocorrência, a microcistina-LR (MCLR). A OMS também publicou a primeira edição de “Cianobactérias tóxicas na água”, em grande parte escrita pelos pioneiros da ciência das cianotoxinas. Desde 1999, as pesquisas sobre cianotoxinas têm crescido exponencialmente e o novo conhecimento gerado nessas duas décadas aprimorou a base de avaliação dos riscos à saúde causados por cianobactérias tóxicas. Agora se sabe mais sobre a gama de cianotoxinas - desde sua ocorrência até os efeitos potenciais para a saúde - e, portanto, podem-se definir prioridades com mais eficácia [78].

A água potável é de suma importância para a saúde humana. Ao longo da história, o acesso à água potável tem sido um pré-requisito para o desenvolvimento das civilizações - e a perda de acesso, muitas vezes, um fator chave para seu declínio. Reconhecendo o papel vital da água potável para a saúde pública, a OMS dedica uma parte significativa de seus esforços para promover a segurança da água hoje e no futuro. Por causa disso, publicou-se em 2021 a segunda edição de “Cianobactérias tóxicas na água”, útil para o desenvolvimento de abordagens sustentáveis de longo prazo, vinculando a gestão ambiental à saúde pública, à



medida que os países se esforcem para cumprir seus compromissos no âmbito da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável [78].

Na legislação Brasileira, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que é o órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA), que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, estabeleceu nas Resoluções CONAMA N°357/2005, alterada e complementada pelas Resoluções CONAMA N°370/2006, N°393/2007, N° 397/2008, N° 410/2009 e N° 430/2011, onde dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes [79]

### 2.5.1 Florações de algas nocivas (FANs) e Cianotoxinas

Algumas cepas de cianobactérias, também conhecidas como algas verdes azuladas ou florações de algas nocivas (FANs ou HABs- do inglês Harmful algal blooms), podem produzir toxinas, chamadas especificamente de cianotoxinas, ocorrem em vários sistemas de água (doce, salobra e marinha) em todo o mundo e é um problema notável para quase todos os continentes e países. Essas FANs causam danos aos ecossistemas naturais e representam um grande perigo para humanos e animais, contaminando a água potável, a água usada na irrigação agrícola, para fins recreativos e para o cultivo ou simplesmente sustentando a vida de espécies aquáticas. Olhando para o futuro, a maioria dos especialistas prevê que as condições ambientais induzidas pelas mudanças climáticas irão apenas exacerbar a frequência e a gravidade das FANs nos sistemas aquáticos. Muitas das áreas impactadas pela formação das FANs e as cianotoxinas que elas produzem podem ser vistas na Figura 2.19 [80, 81].

A atividade antropogênica e o aquecimento global são identificados como os principais fatores envolvidos na crescente presença das FANs. De acordo com seu efeito tóxico, as cianotoxinas são classificadas principalmente da seguinte forma [81]:

- Hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas): estão implicadas na inibição das proteínas fosfato 1A e 2A, que causam hiperfosforilação dos filamentos do citoesqueleto, deformação dos hepatócitos, promoção do câncer e lesão hepática.
- Neurotoxinas (anatoxinas, **saxitoxinas** e análogos e  $\beta$ -metilamino-l-alanina): são alcaloides de baixo peso molecular que bloqueiam os canais de sódio inibindo a condução nervosa.
- Citotoxinas (cilindrospermopsina CYN): estão envolvidas na inibição da glutatona, síntese de proteínas e são responsáveis por danos necróticos e genéticos.

Figura 2.19 Rede de áreas impactadas pelas florações de algas nocivas (FANs) e as cianobactérias que eles produzem. Estes incluem, mas não estão limitados a: (a) agricultura, (b) vida marinha, (c) pesca, (d) moluscos de concha/restaurantes e (e) água potável.

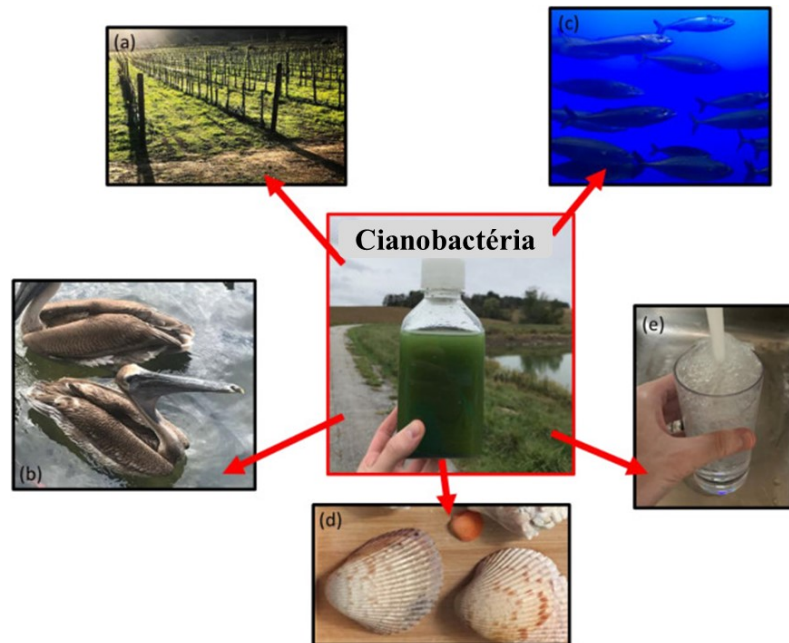


Figura modificada da referência [80]

Embora as listadas anteriormente sejam as mais presentes, dermatoxinas (lingbyatoxina, aplisiatoxina e debromoapliatoxina) e toxinas irritantes (endotoxinas lipopolissacarídicas) também podem estar presentes e são responsáveis pela irritação da pele e inflamação do trato gastrointestinal, respectivamente. A principal via de exposição é geralmente a ingestão, mas as cianotoxinas também podem ser aerossolizadas sob certas condições, visto que foram encontradas nas passagens nasais de residentes da costa.

As microcistinas são produzidas por *Microcystis*, uma espécie de cianobactéria típica de bacias de água doce e geralmente responsável por problemas relacionados às cianotoxinas. Outras toxinas, como anatoxina-a (ATX) e cilindropermopsinas (CYNs), são produzidas por *Anabaena* e várias outras espécies de cianobactérias de água doce. As saxitoxinas (STXs) também podem ser produzidas por várias espécies de dinoflagelados marinhos. Esses grupos geralmente representam as toxinas cianobacterianas mais discutidas e suas estruturas químicas podem-se observar na Figura 2.20. No entanto, 70 congêneres dessas toxinas foram isolados, confirmando a necessidade de se estabelecer um monitoramento em profundidade para garantir a segurança da qualidade da água e dos alimentos e preservar a saúde humana [81].

Figura 2.20 Estruturas químicas das principais cianotoxinas relevantes em amostras ambientais e alimentares.

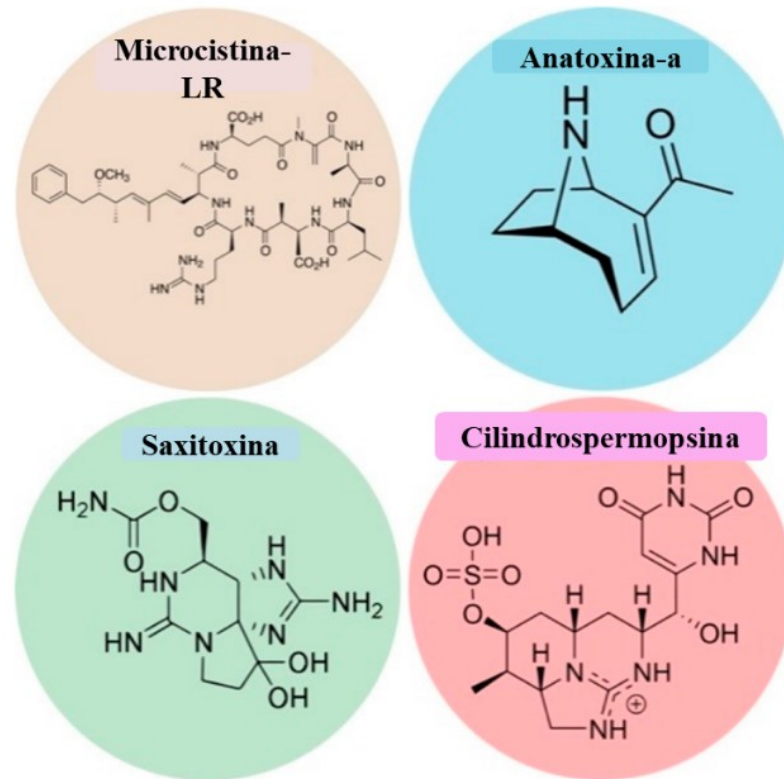


Figura modificada da referência [81]

### 2.5.2 Eventos importantes de intoxicação por cianotoxinas

A exposição humana às cianotoxinas por meio do consumo de água potável tem sido documentada nas últimas décadas em todo o mundo. Em 1979, em Palm Island Queensland, Austrália, mais de 100 crianças apresentaram problemas gastrointestinais, e as autoridades locais associaram o surto à fonte de abastecimento de água local e às toxinas contidas nela, que foram caracterizadas só anos depois, descobrindo que se tratava da cilindrospermopsina (CYN), que não era conhecida na época [82]. Em 1996, em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, no Brasil, pelo menos 52 mortes de pacientes foram atribuídas a toxinas envolvendo cianobacteriana [83]. Em maio de 2007, no Lago Taihu, Wuxi, China, umas FANs de *Microcystis aeruginosa*, resultou em problemas de cor, sabor e odor para milhões de pessoas que dependiam do lago como sua fonte de água potável. Essa poluição resultou em pânico público, na inadequação da água e impactos econômicos na área. As FANs foram atribuídas às descargas de águas residuais industriais e domésticas. No Lago Erie, nos EUA, também já foram registradas ocorrências de Ciano-FANs, e nos últimos anos,

os surtos vêm afetando a qualidade da água potável, sendo o norte de Ohio um dos mais afetados. Por causa disso, em 2013, seis casos de infecção gastrointestinal aguda relacionada às cianotoxinas foram relatados em Carroll Township e 110 casos em Toledo em 2014, por conseguinte, duas concessionárias de água potável foram forçadas a fechar nessa região. Além do mais, florações recorrentes podem ser encontradas em alguns dos maiores ecossistemas de água doce do mundo, incluindo o Lago Michigan (EUA – Canadá), Lago Okeechobee (Flórida, EUA), Lago Pontchartrain (Louisiana, EUA), Lago Victoria (África), Lago Taihu (China) e águas estuarinas e costeiras, por exemplo, Mar Báltico, Mar Cáspio, afluentes da Baía de Chesapeake, Sound Albemarle-Pamlico na Carolina do Norte, Baía da Flórida, Estuário do Rio Swan na Austrália e Lagoa dos Patos e outros estuários de lagoa costeira no Brasil, entre outros [82].

### 2.5.3 Saxitoxina (STX)

A STX e seus congêneres são um grupo de neurotoxinas conhecidas como toxinas paralisantes de moluscos (PSTs, do inglês, paralytic shellfish toxins). Esta denominação é derivada da ingestão de moluscos contaminados que se alimentam de cianobactérias tóxicas, resultando em uma síndrome neurotóxica chamada PSP (do inglês, paralytic shellfish poisoning), traduzida como “envenenamento paralisante de moluscos”. As PST/PSP também são apelidadas como as toxinas das “marés vermelhas”. Elas são as toxinas de FANs mais significativas em termos de saúde pública [80–82, 84, 85]. Os dinoflagelados eucarióticos (*Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.) são a principal fonte das PSTs em águas marinhas, enquanto as cianobactérias (*Anabaena* sp., alguma *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* sp., *Lyngbya* sp., *Planktothrix* sp.) são os principais produtores de água doce [81, 86]. PSTs compreendem 57 alcalóides de guanidina tricíclicos estruturalmente relacionados com toxicidade variável. Como mostrado na Figura 2.21, dependendo dos grupos funcionais R1, R2, R3 e R4 (R4-1, R4-2, R4-3, R4-4), eles são amplamente classificados em saxitoxinas (STXs), neosaxitoxinas (NeoSTXs), gonyautoxinas (GTXs) e saxitoxinas descarbamoil (dcSTX) [78, 82], respectivamente. Deste grupo, a STX de estrutura molecular  $C_{10}H_{17}N_7O_4$  e uma massa molar de 299,29g/mol, é a toxina representativa mais estudada por ser a mais tóxica [86]. A STX, um tipo de cianotoxina isolada inicialmente de moluscos bivalves do gênero clam (molusco de areia), é um derivado da tetra-hidropurina, os sítios ativos estão principalmente em dois grupos agmatina e dois grupos hidroxila [87]. A STX, uma molécula catiônica que dissolve facilmente na água, é estável em alta temperatura e

solução ácida, é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal e não pode ser destruída pelas enzimas digestivas humanas, o que representa uma grande ameaça à saúde humana. No entanto, a oxidação da STX em condições alcalinas pode privá-la de sua toxicidade [85, 87].

Figura 2.21 A) Estrutura geral das saxitoxinas (STXs) B) Dependendo dos grupos funcionais R1, R2, R3 e R4(R4-1, R4-2, R4-3, R4-4), a família pode ser subdividida em quatro grupos: saxitoxinas (STXs), neosaxitoxinas (NeoSTXs), gonyautoxinas (GTXs) e saxitoxinas descarbamoil (dcSTX), respectivamente.

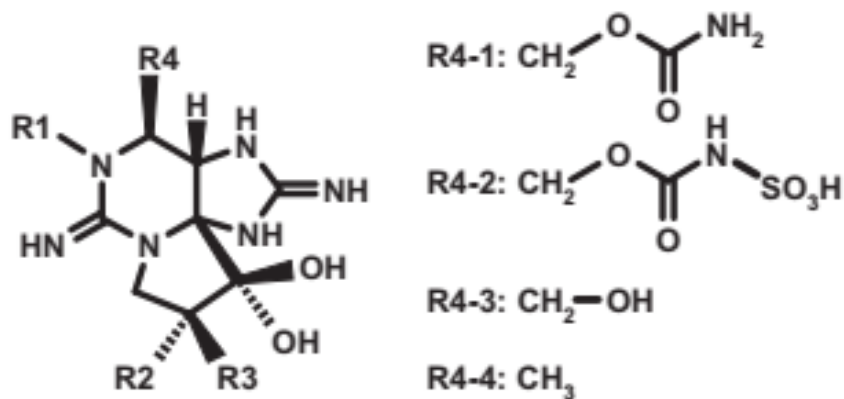


Figura retirada da referência [78]

A STX uma vez absorvida pelo trato gastrointestinal age como um bloqueador altamente potente dos canais de sódio e cálcio controlados por voltagem, bem como dos canais de potássio no coração [85]. A STX bloqueia seletivamente os canais de sódio nas células excitáveis em um processo de ligação ao receptor específico de alta afinidade e reduz o número de canais condutores de  $\text{Na}^+$  [84]. O mecanismo tóxico da STX consiste em inibir a condução nervosa ao afetar os canais de sódio. A STX pode se ligar aos receptores de toxinas nas proteínas do canal de sódio em neurônios e miócitos, bloqueando assim os canais de sódio e provocando um distúrbio neuromuscular e sintomas de paralisia muscular no corpo humano [87]. A STX podem se difundir através da barreira hematoencefálica, resultando em uma variedade de sintomas neurológicos que culminam em parada respiratória e choque cardiovascular [84].

A grande maioria dos dados clínicos, epidemiológicos e toxicológicos relatados sobre STXs na literatura foram obtidos de casos de envenenamento após o consumo de moluscos que acumulam STX produzida por dinoflagelados marinhos; porém, como a estrutura química é a mesma das STXs produzida por cianobactérias, o perfil toxicológico é similar [78]. A STX e seus derivados produzem sintomas 30 minutos após a ingestão, que

incluem formigamento na boca e nas extremidades ou queimação nos lábios, língua e garganta, podendo progredir para transpiração, náusea, vômito, diarreia e para a perda de controle muscular e dificuldade para respirar. Se a dose ingerida for suficiente, pode ocorrer a morte em 2 a 12 horas devido à paralisia estendida do sistema respiratório e não há antídoto conhecido, portanto o tratamento clínico é restrito a cuidados de suporte [80, 82, 85].

Como a STX pode entrar na cadeia alimentar por acumulação em bivalves e peixes que se alimentam por filtração, existe um risco proeminente para a saúde humana [88]. Esse mecanismo da STX tem um grande impacto ambiental e econômico, já que sua presença em moluscos bivalves como mexilhões, marisco, ostras e vieiras leva à proibição da colheita comercial e recreativa de moluscos em muitas águas costeiras ao redor do mundo [80, 86]. A presença de STX em sistemas de água ou produtos de frutos do mar é uma preocupação primordial, tanto desde uma perspectiva de saúde pública quanto econômica, uma vez que globalmente existem aproximadamente 2000 casos relatados de PSP por ano com uma taxa de mortalidade de 15% [80].

Em 2009, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, do inglês, European Food Safety Authority) revisou cerca de 500 casos de PSP em humanos, descritos em relatórios de casos que estimaram o consumo de STXs associado a uma variedade de sintomas. Esta análise estabeleceu a dose aguda de referência para 0,5 $\mu$ g de STX por kg de peso corporal (equivalente a 75ppb ou 30 $\mu$ g de STX por porção de 400g para um adulto de 60kg) [78, 86]. Baseada nessa dose aguda de referência, a OMS calculou o valor limite para ingestão aguda de STX em água potável em uma concentração de 3 $\mu$ g/L e determinou o valor de referência para exposição de STX em águas para uso recreativo numa concentração de 30 $\mu$ g/L [78]. Desde uma perspectiva global, a maioria dos países estabeleceu o padrão para a água potável entre 1–3 $\mu$ g/L, especificamente a Legislação do Brasil considera o valor dado pela OMS de 3 $\mu$ g/L para água potável [11, 79]. Considerando que a toxicidade da STX varia consideravelmente com a via de administração, os níveis permitidos estão atualmente em revisão [86].

Um limite de tempo para tolerar concentrações de até 3 $\mu$ g/L não pode ser dado devido aos poucos dados sobre os efeitos em doses baixas. Embora atualmente existam na literatura, poucas evidências de danos à saúde decorrentes da exposição crônica a baixas doses de STX [89, 90], é sempre prudente implementar medidas de controle para reduzir a presença de florações de cianobactérias tóxicas ou seu impacto no abastecimento de água potável o mais rápido possível. Dados limitados mostram que as concentrações de STX na

água potável quase sempre estiveram em níveis residuais, indicando que o tratamento convencional da água é geralmente eficaz, desde que a lise celular (destruição ou dissolução da célula) seja evitada [78].

Deve-se notar que os valores de referência para STX em moluscos marinhos são comparativamente altos e, em locais onde a contaminação de moluscos é uma preocupação, água potável contendo STX contribuiria com uma exposição adicional relativamente pequena. No entanto, recomenda-se que as autoridades de saúde considerem e administrem em conjunto esse cenário, especialmente devido à relação dose-resposta relativamente acentuada para essas toxinas [78].

### **2.5.3.1 Detecção convencional vs Biodetecção de STX**

Diversos métodos de detecção e quantificação de cianobactérias foram desenvolvidos com a finalidade de garantir a qualidade da água e dos alimentos e preservar a saúde humana [81]. Convencionalmente, métodos bioquímicos (ensaios de inibição das fosfatases e imunoenaios - teste ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e Cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS, do inglês liquid chromatography–mass spectrometry) são as técnicas mais comuns para detectar e quantificar cianotoxinas. Por exemplo, estas duas técnicas, ELISA e LC-MS, são empregadas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês United States Environmental Protection Agency) para este fim, contando com metodologias oficiais que descrevem protocolos para a detecção de microcistinas e nodularinas totais em amostras de água para ELISA e LC-MS. O método LC-MS é usado quando o investigador precisa de maior sensibilidade e a capacidade de diferenciar congêneres dentro de um grupo de toxinas. No entanto, LC-MS é mais caro e complexo do que ELISA, que é mais eficiente em termos de tempo e economia. O método ELISA é mais frequentemente empregado, pois permite a quantificação total da toxina e fornece informações suficientes para dar orientações sobre o uso da água ao público. As desvantagens do ELISA incluem a necessidade de um ambiente de laboratório (e, portanto, o transporte da amostra) e um limite de detecção (LOD) de aproximadamente 0,1µg/L para microcistinas/nodularinas, o que limita as capacidades de diagnóstico quando as concentrações de toxina são baixas. Em suma, melhorias notáveis para uma técnica de diagnóstico de cianotoxinas seriam nessas duas áreas, tempo de ensaio e LOD [80]. Além dessas abordagens, bioensaios em camundongos (MBA, do inglês mouse bioassay), testes enzimáticos, eletroforese e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês

High Performance Liquid Chromatography) também oferecem estratégias comuns, e suas principais desvantagens incluem configuração experimental complexa, necessidade de pessoal especializado, questões éticas dos testes em animais, alto custo e procedimentos longos [81].

Portanto, o desenvolvimento de outros métodos é necessário para atingir um monitoramento sensível e rápido de toxinas, devido à gravidade da contaminação e posterior perigo da ingestão das toxinas. Os biossensores são alternativas ideais aos métodos analíticos tradicionais para detecção de toxinas [86, 88].

Muitos grupos de pesquisa multidisciplinares se concentraram no projeto de novos biossensores em tempo real, usando uma variedade de abordagens que aumentam a seletividade e a sensibilidade da detecção de cianotoxinas. Os avanços para capturar as cianotoxinas para quantificação direta têm se concentrado em anticorpos, inibição de enzimas, APTs e polímeros com impressão molecular (MIP) [85].

Alguns aptasensores para detecção de STX têm sido desenvolvidos, por exemplo, por análise ótica, estão os colorimétricos [91, 92], de fluorescência [93], Ressonância de plasmon de superfície localizado (SPRL, do inglês Localized Surface Plasmon Resonance) [94], utilizando o Espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, do inglês Surface-Enhanced Raman Scattering) [95], por elipsometria de reflexão interna atenuada [96], por análise eletroquímica, temos um amperométrico [72], por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês Square Wave Voltammetry) [97], utilizando medidas de capacitância-voltagem (C-V) e capacitância constante (ConCap) [13, 98], e o impedimétrico que sustenta essa tese [74], entre outros.

### **2.5.3.2 Lagoa do Peri: Cianobactérias e STX**

A Lagoa do Peri está localizada próximo ao litoral sudeste da Ilha de Florianópolis no estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (27°43'37"S; 48°30'58"O, Figura 2.22). É cercada por encostas cobertas pela Mata Atlântica nas fronteiras sul, oeste e norte e separada do Oceano Atlântico a leste por uma barreira arenosa de 300m a 1000m de largura. Com uma área de 5,7km<sup>2</sup> e profundidade média de 7m, a Lagoa do Peri está 3m acima do nível do mar, não tendo influência direta da água do mar, porém, conectada à Praia do Matadeiro pelo Canal do Sangradouro, como pode ser visto na Figura 2.22 em linha preta sólida, sinalizada com números de #1-5#. O Canal do Sangradouro apresenta, em média, 7m de largura e 90cm de profundidade. A orla da Praia do Matadeiro tem orientação NO-SL com 1200m de extensão.



A Lagoa do Peri também está localizada em um parque municipal, tornando-a um local de lazer [11].

Figura 2.22 Localização da Lagoa do Peri (parte superior) e sinalização do Canal do Sangradouro em linha sólida preta com números de #1-5# (parte inferior).

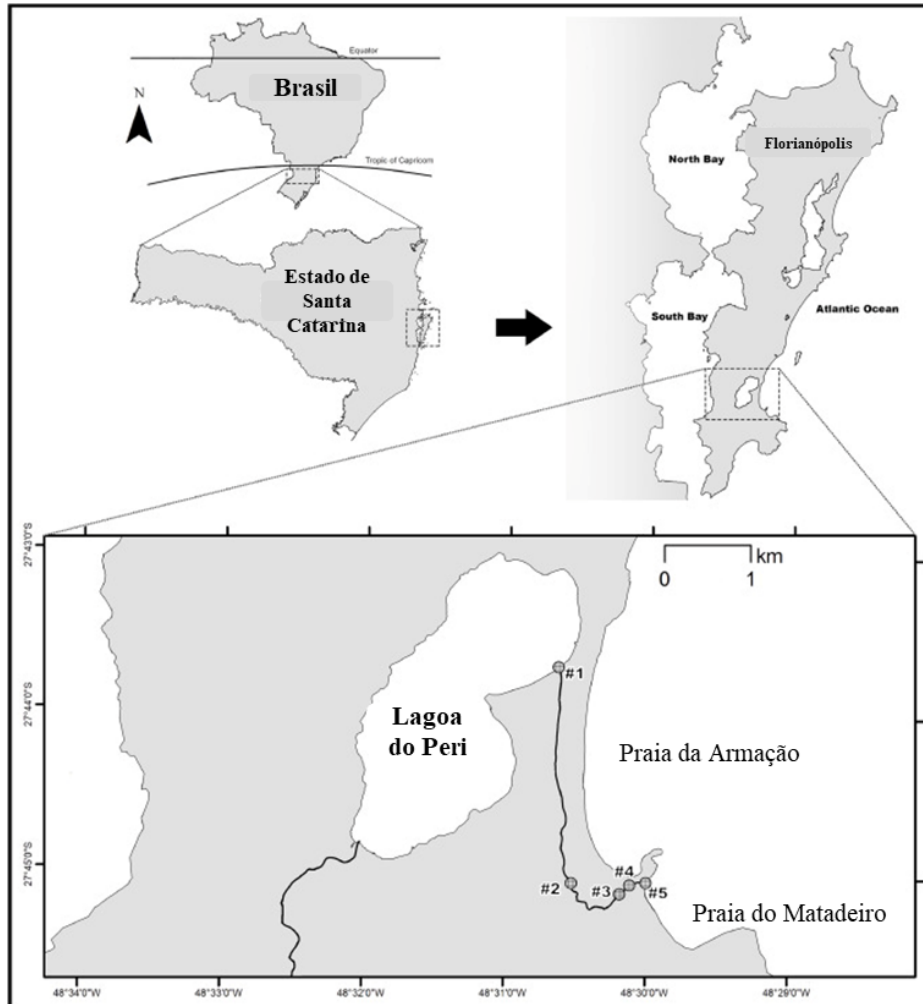


Figura modificada da referência [11]

Desde 1994, tem sido observada na Lagoa do Peri uma população crescente de cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*), respondendo por 90% ou mais da densidade total de fitoplâncton ao longo do ano. Apesar disso, a lagoa é utilizada como fonte de água potável, após tratamento, a mais de 100 mil habitantes. Desde 2014, a empresa responsável pelo abastecimento de água, CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) realiza periodicamente a quantificação de cianobactérias totais e STX no ponto de captação de água. A concentração média de cianobactérias desde então tem sido de  $1,5 \times 10^6$  células/L. Os dados de STX não estão

disponíveis, mas, segundo a empresa, permanecem abaixo do limite de  $3\mu\text{g/L}$  equivalente de STX, conforme definido pelas normas regulatórias Brasileiras [11, 99].

Uma pesquisa recente aponta que toxinas da Lagoa do Peri podem atingir o mar e contaminar moluscos [11]. A concretização dessa probabilidade representaria um perigo, como já mencionado a STX pode entrar na cadeia alimentar por acumulação em bivalves que dela se alimentam, transformando-se em um risco elevado para a saúde pública [88]. Sabe-se que na ilha de Florianópolis um grande número de pessoas vivem da maricultura (criação de mariscos) e uma boa parte são criadouros de ostras.

Perante o exposto, aperfeiçoar o monitoramento nas águas da lagoa do Peri e as ostras dos criadouros próximos, torna-se uma necessidade inadiável, e dado o perigo, a importância de implementar ferramentas de monitoramento rápidas, econômicas e de fácil utilização como os biossensores, resulta ser uma ótima alternativa.

## 2.6 Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica é uma linha de pesquisa que abrange as reações químicas heterogêneas envolvendo transferência de elétrons, reações homogêneas que influenciam as reações nas superfícies dos eletrodos, propriedades de massa dos eletrólitos e propriedades das interfaces (a dupla camada). As reações eletroquímicas podem ser encontradas em campos de pesquisa envolvendo conversão e armazenamento de energia, corrosão, sensores e biossensores, entre outros. Os avanços na instrumentação e modelagem vêm possibilitando o aprimoramento de várias técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica (VC), cronoamperometria e cronopotenciometria, microscopia eletroquímica de varredura e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Esses avanços vêm permitindo cada vez mais o estudo dessas reações em toda essa ampla gama de configurações de aplicação [100].

Do ponto de vista mecanicista, uma reação eletroquímica numa interface eletrodo/eletrólito pode ser decomposta em uma série de processos de várias etapas (transporte de massa, processos de transferência de carga, adsorção), cada um ocorrendo em taxas distintas. As etapas individuais são dependentes do tempo e podem ocorrer em diferentes escalas de tempo. Portanto, o uso de técnicas transitórias como a EIE, que permite a análise de mecanismos dependentes do tempo com base na resposta (corrente ou potencial) do sistema eletroquímico coletado em frequências selecionadas, é necessário para facilitar a avaliação de sistemas eletroquímicos. A técnica de EIE pode fornecer uma compreensão dos mecanismos eletroquímicos que ocorrem em uma interface eletrificada numa única medição.

Esses mecanismos subjacentes incluem aqueles envolvidos na operação de baterias comerciais, a corrosão de metais e ligas e biossensores eletroquímicos [100].

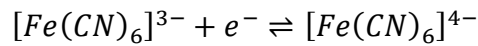
Nesse trabalho, duas técnicas eletroquímicas foram utilizadas, a VC para mostrar as diferenças qualitativas em cada etapa do aptasensor e a EIE para quantificar essas diferenças, a continuação, dá-se detalhes de cada técnica, aprofundando na EIE.

### **2.6.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)**

Durante a segunda metade do século 19, os eletroquímicos começaram a medir a impedância de um eletrodo imerso em um eletrólito usando correntes alternadas. Modelos da cinética das reações eletroquímicas entre um eletrodo e um eletrólito foram publicados para explicar as impedâncias alcançadas no final do século 20. Nesta época, os experimentos mostravam apenas uma capacitância e uma resistência. É no final da década de 1960, que a possibilidade de realizar medições de impedância até frequências muito baixas permite testar esses modelos. O auxílio de novos equipamentos, combinado com o aprimoramento das técnicas de medição para baixas frequências, possibilitou a investigação de vários sistemas eletroquímicos e permitiu que vários modelos fossem propostos. No final da década de 1980, o Primeiro Simpósio Internacional sobre EIE ou EIS (Electrochemical impedance spectroscopy) foi organizado, e os avanços da abordagem da técnica de EIE e suas aplicações foram apresentados, em Bombannes na França. Nas três décadas seguintes, desenvolvimentos da EIE relacionados com diversas aplicações e técnicas ocorreram. Deste modo, novas funções de transferência com base na análise de frequências de diferentes valores que controlam a cinética eletroquímica, medições de impedância para eletrodos não homogêneos, foram derivadas para obter constantes de velocidade e coeficientes de difusão de fenômenos interfaciais [101].

Entre outras abordagens da técnica de EIE, existem duas que são muito usadas em aplicações de biossensores impedimétricos: Faradaicas e não-Faradaicas. Em um método não Faradaico, normalmente não ocorre transferência de elétrons entre os eletrodos. O objetivo consiste em detectar mudanças de capacitância na dupla camada. Como ela está localizada próxima à superfície do eletrodo, pode ser usada para detectar a ligação de biomarcadores aos eletrodos funcionalizados com elementos de bio-reconhecimento como APTs, enzimas ou anticorpos. Em contraste, as abordagens Faradaicas usam eletrólitos contendo uma alta concentração de espécies redox (redução-oxidação) que, impulsionadas por uma tensão aplicada, sofrem reações eletroquímicas reversíveis e aumentam a transferência de elétrons

através da interface eletrólito-eletródo [102]. Uma sonda redox comumente usada é o ferri/ferrocianeto  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ , que sofre a reação:



No que respeita à biodeteção, a EIE é uma técnica poderosa usada para a análise de propriedades interfaciais relacionadas a eventos de bio-reconhecimento que ocorrem na superfície do eletródo, como reconhecimento anticorpo-antígeno, interação substrato-enzima ou captura de analitos por APTs, entre outros. Assim, a EIE pode ser explorada em vários diagnósticos biomédicos importantes e aplicações ambientais [103].

A EIE é uma técnica eletroquímica onde a impedância em um circuito é medida em Ohm (como unidade de resistência). Sobre outras técnicas eletroquímicas, a EIE oferece várias vantagens, dependendo do fato de ser uma técnica de estado estável, que utiliza análise de pequenos sinais e que é capaz de sondar relaxações de sinal em uma faixa muito ampla de frequência aplicada, de menos de 1mHz a mais de 1MHz, usando estações de trabalho eletroquímicas comercialmente disponíveis (Potenciostatos). A teoria da EIE e sua interpretação de dados podem ser às vezes complicadas para pesquisadores que não estão familiarizados com ela, como biólogos, bioquímicos ou cientistas de materiais [103].

A impedância difere da resistência, pois a resistência observada em circuitos CC obedece diretamente à Lei de Ohm. Diferentemente, uma pequena excitação de sinal é aplicada para medir a resposta de impedância. A resposta da célula eletroquímica é pseudo-linear, na qual uma diferença de fase é adquirida enquanto a resposta da corrente a um potencial senoidal é um senoide (ou sinusóide) na frequência aplicada. Assim, o sinal de excitação é apresentado como um potencial em função do tempo  $E(t)$ , como mostra a Equação [103–106]:

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad (1)$$

Onde  $E_0$  é a amplitude do sinal e  $\omega$  a frequência angular. A correlação entre a frequência radial ( $\omega$ ) e a frequência aplicada ( $f$ ) é calculada pela Equação:

$$\omega = 2\pi f \quad (2)$$

Em eletroquímica CA, um sinal de potencial (ou corrente) senoidal é aplicado a um sistema eletroquímico e o sinal de corrente (ou potencial) resultante é registrado e analisado pelo sistema. A frequência e a amplitude do sinal de entrada são ajustadas pelo usuário no equipamento, enquanto o sinal de saída normalmente tem a mesma frequência que o sinal de entrada, mas sua fase pode ser deslocada por uma quantidade finita  $\phi$ , como é mostrado na Figura 2.23. Essa corrente resultante  $I(t)$  pode ser expressada como [103–106]:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t - \phi) \quad (3)$$

Onde  $I_0$  é a amplitude do sinal e  $\phi$  a diferença de fase.

Figura 2.23 Na EIE um potencial de entrada  $E(t)$  é aplicado através de um sistema eletroquímico, resultando numa corrente  $I(t)$  de saída com uma diferença de fase  $\phi$ .

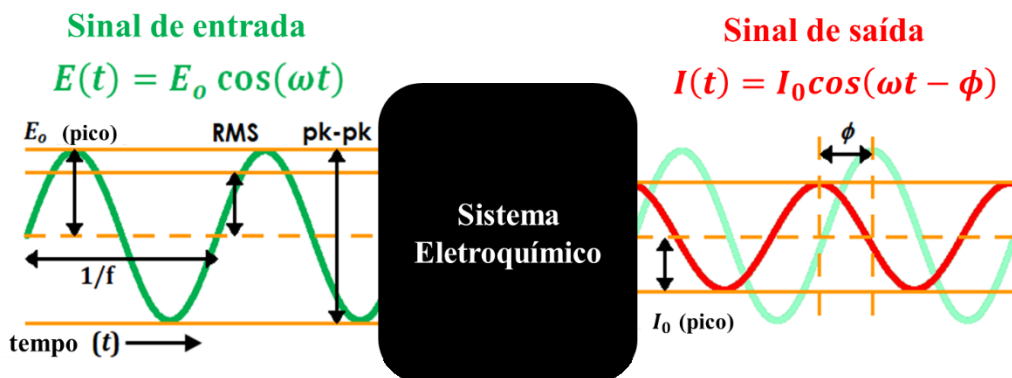


Figura modificada da referência [107]

A impedância é definida segundo a equação [103–106]:

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} \quad (4)$$

Uma reorganização matemática mais conveniente das formas de onda aplicadas e resultantes das Equações (1) e (3) é necessário para definir a impedância medida. Isso é feito usando coordenadas complexas por meio da fórmula de Euler [104–106], que é definida como:

$$e^{i\theta} = \cos \theta + i \sin \theta \quad (5)$$

Onde  $i$  representa a unidade imaginária ( $i^2 = -1$ ) e  $\theta$  é qualquer número real. Fazendo um rearranjo nas Equações (1) e (3) utilizando a Equação (5) e substituindo na Equação (4), resulta [103–106]:

$$Z(t) = |Z|e^{i\phi} \quad (6)$$

Onde a magnitude da impedância  $|Z| = \frac{E_0}{I_0}$ , podendo-se observar que a impedância  $Z(t)$  termina por não depender do tempo ( $t$ ), senão das amplitudes dos sinais de entrada  $E_0, I_0$  e da diferença de fase ( $\phi$ ). Detalhes da demonstração da Equação (6) estão disponíveis na referências [108, 109]. Além do mais, a Equação (6) pode ser expressa pela Equação de Euler (5) como [103–106]:

$$Z = |Z|(\cos \phi + i \sin \phi) = Z_r + i Z_i \quad (7)$$

Na literatura e nos Softwares utilizados nos potenciostatos/galvanostatos, acostuma-se chamar à componente real ( $Z_r$ ) de  $Z'$  e à componente imaginária ( $Z_i$ ) de  $Z''$ , essas componentes podem ser expressas da Equação (7) como [104, 105]:

$$Z_r = Z' = |Z| \cos \phi \quad (8.a)$$

$$Z_i = Z'' = |Z| \sin \phi \quad (8.b)$$

Na prática, os equipamentos do laboratório fornecem através dos Softwares, dados e gráficos com as componentes  $Z'$ ,  $Z''$ ,  $|Z|$  e  $\phi$ , entre outros, porém, pode ser útil saber calcular [105, 110]:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (9)$$

$$\phi = \tan^{-1} \left( \frac{Z''}{Z'} \right) \quad (10)$$

Para poder analisar em um sistema eletroquímico os dados gerados pela técnica de EIE é necessário comparar os elementos do sistema eletroquímico com um circuito elétrico equivalente (CEE) que simule o sistema. Esses CEEs podem conter resistências, capacitores ou elementos de fase constante (CPE, do Inglês Constant-phase elements) que com o ajuste das curvas de impedância adequado, podem fornecer valores confiáveis para ser analisados.

Um desses elementos do sistema eletroquímico, que historicamente mais trabalho deu para entender foi a dupla camada elétrica, cuja natureza e evolução explica-se à continuação.

### **2.6.1.1 A Dupla Camada Elétrica (DCE)**

As origens da EIE estão contextualizadas na investigação do fenômeno elétrico interfacial em uma superfície eletrodo-líquido e se remontam a Volta em 1800, que mostrou que uma interface eletrodo-eletrólito era a fonte de um potencial elétrico e que isso poderia ser usado como uma bateria para fornecer eletricidade de CC. Naquela época, suspeitava-se que a interface eletrodo-eletrólito tinha a propriedade de capacitância e isso foi demonstrado pela primeira vez em 1871 por Varley, que realizou uma série de experimentos com placas de platina mergulhadas em uma mistura de ácido sulfúrico e água, ficando particularmente impressionado com o tamanho da capacitância medida. A natureza da DCE tem sido objeto de pesquisa e aprimoramento desde sua descrição inicial proposta por Helmholtz em 1853-79, onde foi descrita como sendo uma camada compacta de dipolos polarizados, localizada muito próxima à superfície dos eletrodos. Mais tarde, em 1913, Gouy-Chapman desenvolveram uma abordagem de camada mais difusa, levando em consideração o movimento térmico dos íons. De acordo com este modelo, a queda de potencial através da camada difusa diminui exponencialmente em função da distância de acordo com o comprimento de Debye (ou parâmetro de Debye-Hückel). Em 1924, Stern adotou a abordagem de combinar os principais elementos dos modelos de Helmholtz e Gouy-Chapman para fornecer uma descrição aprimorada da DCE. Esse modelo, às vezes conhecido como Gouy-Chapman-Stern, consiste em uma camada compacta de Helmholtz e uma camada difusa de Gouy-Chapman, conforme mostrado na Figura 2.24. Outros aperfeiçoamentos e modelos para eletrólitos e materiais de eletrodos mais específicos foram seguidos nos anos subsequentes. Uma contribuição significativa foi o trabalho de Grahame em 1957, quem para soluções aquosas considerou necessário incluir uma contribuição para as propriedades da DCE decorrentes da mudança da superfície dos dipolos de água. Atualmente, este modelo de Grahame em combinação com a equação de Gouy-Chapman fornece uma descrição geral da natureza da DCE para a maioria dos eletrólitos aquosos e é válido para a maioria dos tipos de metais e também para muitos solventes não aquosos [102].

Figura 2.24 Estrutura da dupla camada elétrica feita a partir das contribuições de Helmholtz, Stern, Gouy e Chapman.

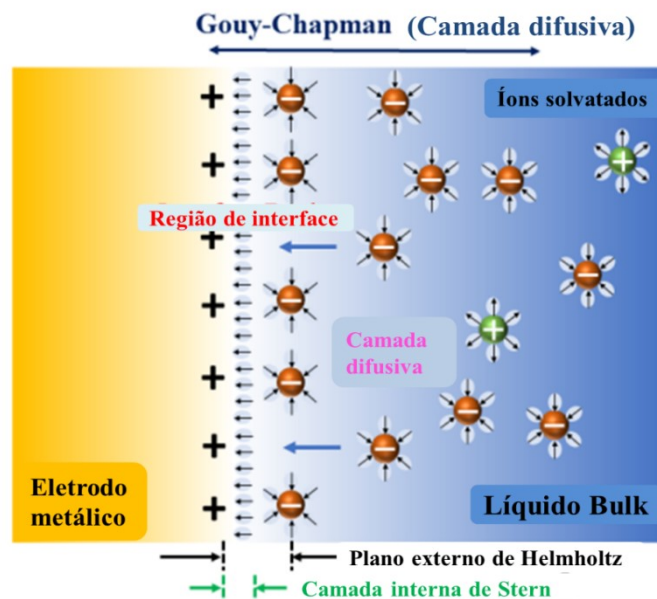


Figura modificada da referência [102]

Em uma célula eletroquímica convencional, as interações matéria–espécies redox–eletrodo incluem a concentração de espécies eletroativas, transferência de carga e transferência de massa desde a solução bulk até a superfície do eletrodo, além da resistência do eletrólito. Cada uma dessas características pode ser explicada por um circuito elétrico que consiste em resistências, capacitores ou elementos de fase constante (CPE, do Inglês Constant-phase elements) que são conectados em série ou em paralelo para formar um circuito elétrico equivalente (CEE). Assim, a EIE pode ser usada para explorar processos de transferência de massa, transferência de carga e difusão. Portanto, a EIE tem a capacidade de estudar as propriedades intrínsecas do material ou processos específicos que podem influenciar a condutância, resistência ou capacitância de um sistema eletroquímico [102, 103, 106]. O entendimento da natureza da DCE foi parte essencial para propor um CCE para análise dos sistemas eletroquímicos, no seguinte item, explica-se a evolução desses circuitos.

### 2.6.1.2 Evolução dos Modelos de Circuitos Elétricos Equivalentes (CEEs)

As descrições de modelos de CEEs baseados nas propriedades de elementos de circuitos elétricos conhecidos desempenharam um papel enorme em ajudar a entender a interface eletrodo-eletrólito. Os primeiros passos para desenvolver uma abordagem de um modelo de CEE e entender a capacitância da interface eletrodo-solução através desse modelo,



veio em 1879, quando Helmholtz propôs que existia uma dupla camada de carga em uma interface eletrodo-eletrólito, como mostrado na Figura 2.25a. Como explicado no item anterior, Helmholtz propôs que a dupla camada consistia em cargas positivas e negativas separadas por uma curta distância que se assemelhava à natureza capacitiva das medições nesses sistemas. Seriam mais 20 anos até que este modelo de CEE simples fosse aperfeiçoado, quando Emil Warburg, em 1899, determinou que mediante a aplicação de uma corrente muito pequena, a magnitude da capacitância ( $C_W$ ) variava inversamente com a raiz quadrada da frequência ( $f$ ) e que a reatância ( $X_W$ ) era igual à resistência ( $R_W$ ) com o ângulo de fase constante em 45 graus, como mostrado na Figura 2.25b. Warburg introduziu o conceito de que com uma baixa densidade de corrente a interface é mais bem representada por um CEE em série, consistindo de um capacitor e um resistor. No entanto, esse simples modelo de CEE em série previa falsamente uma impedância infinita no caso de uma medição de corrente contínua (frequência zero) e, portanto, faltava um mecanismo para transferência de carga através do capacitor, conhecido como resistência Faradaica. Melhorias adicionais sobre este modelo inicial não vieram até muito mais tarde. Em 1932, Fricke relatou que a capacitância de polarização ( $C_W$ ) e o ângulo de fase ( $\phi$ ) eram realmente dependentes das espécies de metal e eletrólito e variavam como  $C_W = C_p = \omega^{-m}$  e  $\phi = m\pi/2$ , respectivamente, e com  $m$  tipicamente variando entre 0,15 e 0,32, como mostrado na Figura 2.25c. Então, em 1947, o trabalho experimental de John Randles levou ao desenvolvimento de um CEE, consistindo de uma capacitância de Helmholtz ( $C_p$ ) de dupla camada em paralelo com uma impedância “Faradaica”, consistindo de uma resistência ( $R$ ) e uma capacitância ( $C$ ), como mostrado na Figura 2.25d. A célula de Randles tornou-se particularmente conhecida devido à sua simplicidade e inclusão de todos os principais elementos de uma interface eletroquímica. Hoje em dia, a célula de Randles é mais comumente representada como a mostrada na Figura 2.25e. O CEE de Randles consiste em uma resistência da solução eletrolítica ( $R_s$ ), em série com um conjunto composto de uma capacitância de dupla camada ( $C_{dc}$ ) em paralelo com uma combinação em série da resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ) e o elemento Warburg ( $W$ ). Esse elemento de Warburg é usado para representar especificamente a reação eletroquímica em sítios ativos redox e se relaciona com o atraso decorrente da difusão das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo [102, 103]. Frequentemente, o capacitor perfeito da dupla camada ( $C_{dc}$ ) não existe regularmente, portanto, um elemento substitutivo chamado elemento de fase constante (EFC) é utilizado para imitar/modelar esse

comportamento capacitivo não ideal. As razões discutidas por trás disso incluem rugosidade da superfície, não homogeneidade ou porosidade da superfície dos materiais investigados [111]. Devido à sua simplicidade, o CEE de Randles ainda é muito popular até hoje e frequentemente usado como ponto de partida para determinar os diferentes parâmetros em um sistema eletroquímico desconhecido ou usado como base para o desenvolvimento de um modelo mais complexo. No entanto, sistemas eletroquímicos reais são tipicamente mais complicados e outros modelos de CEEs podem precisar ser procurados para a aplicação específica envolvida.

Figura 2.25 a) Dupla camada de Helmholtz e O b) modelo de circuito de Warburg com melhorias adicionais por c) Fricke e d) Randles. e) Célula de Randles moderna.

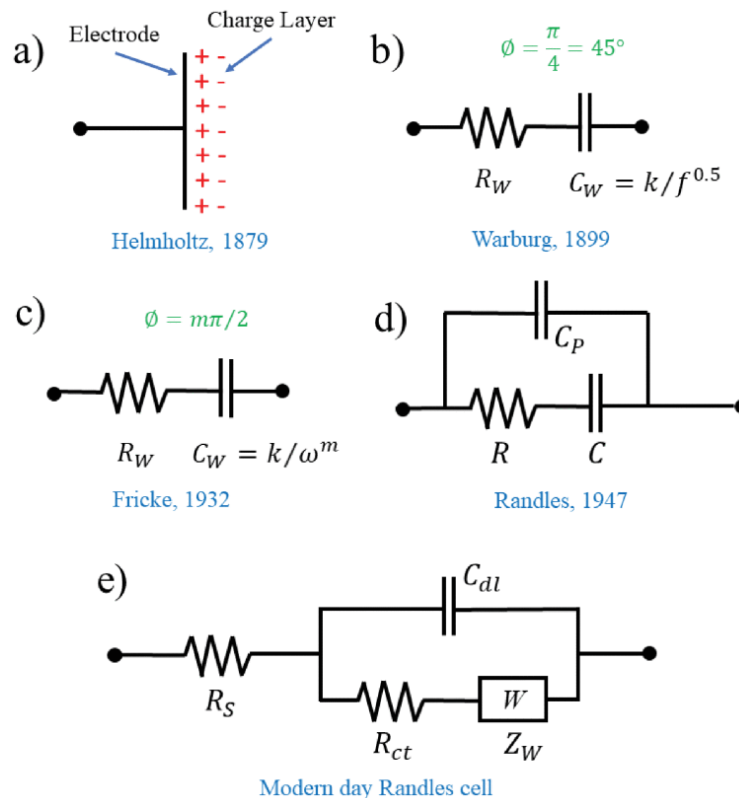


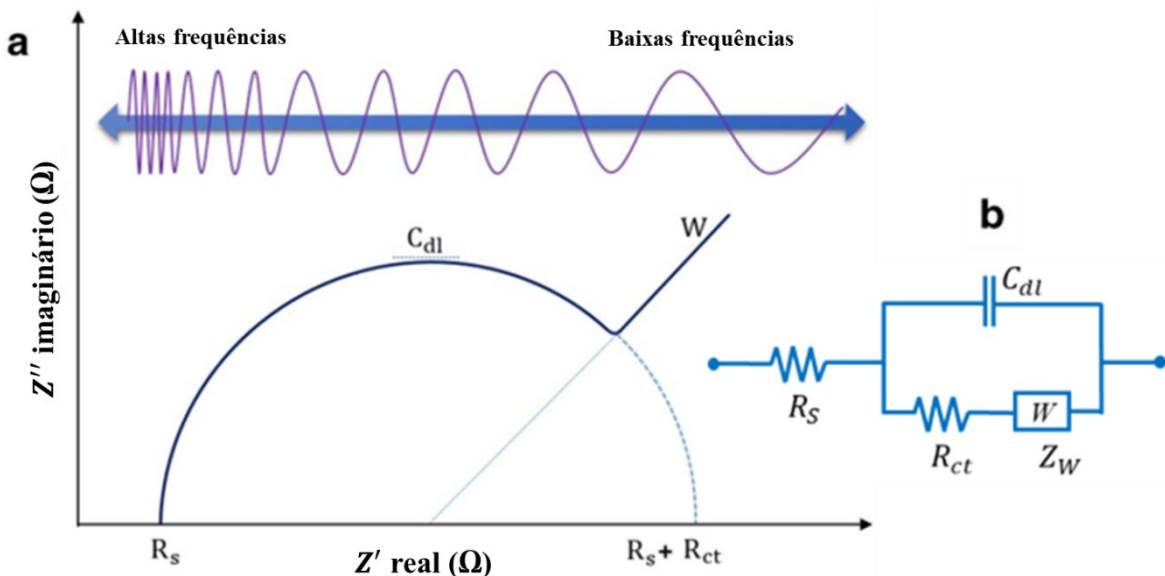
Figura retirada da referência [102]

### 2.6.1.3 Representações da EIE

A obtenção de um espectro de impedância eletroquímica normalmente envolve a aplicação de um pequeno potencial senoidal enquanto mede a corrente e varre lentamente através de uma faixa de frequências, tipicamente de alguns Hz (ou mHz) a centenas de kHz (ou alguns MHz). Os dados resultantes podem ser plotados de várias maneiras, uma das

representações mais comuns são os diagramas de Argand ou mais comumente chamados de gráficos de Nyquist, embora o nome “gráfico de Nyquist” seja frequentemente usado na literatura eletroquímica, ele não é preciso porque os gráficos de Nyquist são usados para avaliar a estabilidade de um sistema com realimentação [110]. O diagrama de Nyquist é tipificado pela plotagem da impedância imaginária ( $Z''$ ) versus a impedância real ( $Z'$ ). O diagrama de Nyquist, mesmo que não apresente a frequência de forma explícita, tem a vantagem de que a resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ), a impedância de Warburg ( $W$  ou  $Z_W$ ) e as constantes de tempo podem ser facilmente determinadas, como mostrado na Figura 2.26a e com maior precisão com o ajuste das curvas de impedância utilizando o CEE de Randles, mostrado na Figura 2.26b. É necessário destacar na Figura 2.26a, que a medida de EIE começa com altas frequências, ou seja, do lado esquerdo de  $Z'$  (início do semicírculo) e que as frequências vão diminuindo (sem mudanças na amplitude da onda) conforme o semicírculo aumenta para o lado direito de  $Z'$  até chegar às frequências menores onde acontece a difusão ou impedância de Warburg, cuja presença pode ser vista pela linha reta com um ângulo de  $45^\circ$  em relação à abscissa [32, 102, 103].

Figura 2.26 a. O gráfico de Nyquist ( $Z''$  vs  $Z'$ ) b. O CEE de Randles para o ajuste das curvas de impedância.

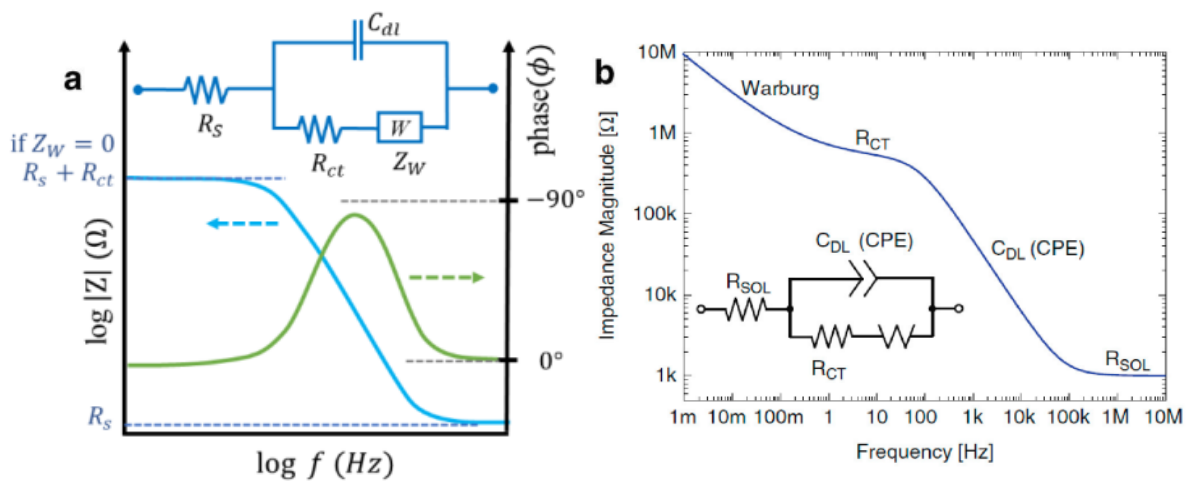


Figuras modificadas das referências [32, 102]

Outra representação que pode ser feita com os dados gerados por uma EIE, é o diagrama de Bode, mostrado na Figura 2.27, que possui a vantagem de que os dados de medição principais são apresentados em um único gráfico que destaca melhor o efeito da

frequência na capacitância e na fase. Nos gráficos de Bode, que envolvem plotar o módulo da impedância ( $|Z|$ ),  $Z'$  ou  $Z''$  no eixo esquerdo das ordenadas em escala logarítmica (se precisar) e/ou o ângulo de fase ( $\phi$ ) no eixo direito das ordenadas versus a frequência ( $f$ ) no eixo das abcissas, em uma escala logarítmica [102, 103]. É preciso salientar, que no diagrama de Bode, embora as frequências apareçam no eixo das abcissas de menor a maior, as medidas no equipamento são feitas ao contrário, ou seja, das frequências maiores às menores, como explicado e mostrado anteriormente no diagrama de Nyquist (Figura 2.26a), então o diagrama de Bode deve ser lido no eixo das abcissas, de direita para esquerda, para ser comparado com o diagrama de Nyquist. Além disso, é importante mencionar, que da mesma forma que em um digrama de Nyquist, as curvas num diagrama de Bode podem também ser ajustadas com o CEE de Randles, inserido nas Figuras 2.27a e 2.27b.

Figura 2.27 Diagramas de Bode log-log do módulo da impedância ( $|Z|$ ) vs a frequência ( $f$ ) e inseridos os CEEs de Randles para o ajuste das curvas a. Com a fase ( $\phi$ ) e sem difusão de Warburg ( $Z_W$ ) b. Sem a fase e com a impedância de  $Z_W$ .



Figuras retiradas das referências [102, 103]

Em conclusão, devido a todas essas características e vantagens, a EIE é uma técnica amplamente implementável em biossensores, que pode ser aplicada em muitos campos, desde a detecção de doenças até o monitoramento ambiental. A EIE como ferramenta de biossensoriamento permite a detecção de uma ampla gama de analitos em aplicações point-of-care (POC). O desenvolvimento de biossensores que utilizam a EIE, chamados de impedimétricos, tem mostrado resultados promissores para a indústria médica em termos de diagnóstico e prognóstico para vários biomarcadores. Os biossensores impedimétricos oferecem um sistema de baixo custo e tempos de detecção rápidos usando quantidades

mínimas de volumes de amostra, ao mesmo tempo em que perturbam minimamente a amostra em estudo devido aos sinais de baixa amplitude. Essas propriedades tornam a técnica altamente sensível e específica [112].

### 2.6.2 Voltametria cíclica (VC)

A VC é uma medida potenciodinâmica que envolve a medição da corrente enquanto se aplica um potencial de CC que é aumentado linearmente de um potencial negativo para um potencial positivo e vice-versa de maneira cíclica. A taxa de mudança de tensão ao longo do tempo é conhecida como taxa de varredura ( $V/s$ ). O potencial é medido entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, enquanto a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. Os dados são representados como corrente ( $I$ ) versus potencial aplicado ( $E$  ou  $V$ ). Picos e vales nos voltamogramas cíclicos podem ser usados para identificar reações redox (redução e oxidação), conforme mostrado na Figura 2.28. Durante a varredura, as reações químicas redox geram uma corrente Faradaica adicional, enquanto o acúmulo de íons nos eletrodos (carregamento) leva a uma corrente capacitiva muito menor, que geralmente tem um perfil retangular de largura muito fina (ver linha pontilhada vermelha na Figura 2.28). Se a subtração da corrente capacitiva for desejada, uma varredura de VC com apenas a solução eletrolítica e não contendo espécies Faradaicas pode ser realizada e subtraída após o experimento principal. Normalmente, no entanto, a corrente capacitiva é pequena e muitas vezes pode ser ignorada [102].

Na literatura, aptasensores impedimétricos para detecção de cianotoxinas sobre um eletrodo de Au, que utilizam VC para complementar as medidas de EIE e observar mudanças qualitativas e quantitativas em cada etapa do aptasensor, tem sido desenvolvidos, entre outros, temos para ácido ocadaico [52], Microcistina-LR (MCLR) [73], Cilindropermopsina [57], Anatoxina-a [56] e sustentando esse trabalho de tese foi publicado um artigo para STX [74].

Figura 2.28 Um voltamograma cíclico mostrando a presença de uma reação eletroquímica redox caracterizada por picos de redução (catódicos) e de oxidação (anódicos) nos potenciais  $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ , respectivamente, e as correntes catódica ( $i_{pc}$ ) e anódica ( $i_{pa}$ ) associadas.

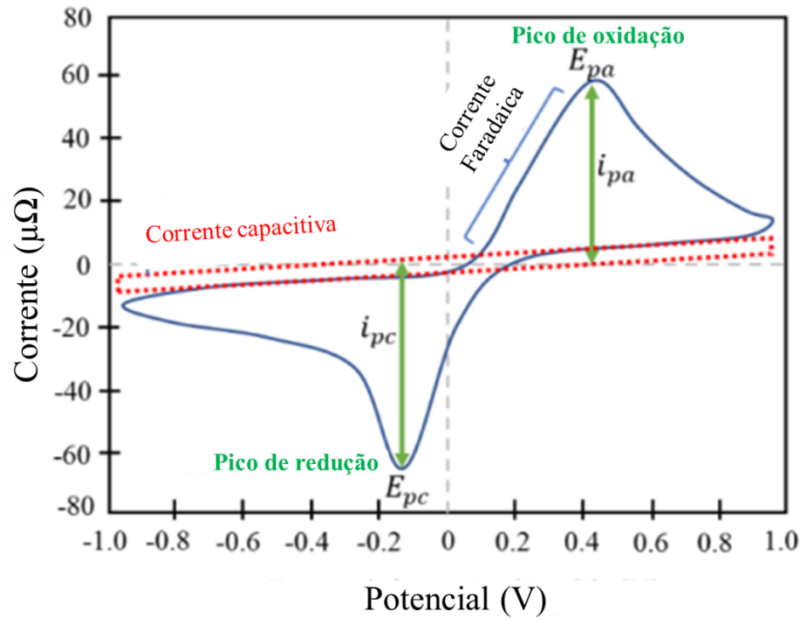


Figura modificada da referência [102]

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Nessa seção será apresentada a informação detalhada dos materiais, protocolos e métodos experimentais empregados em cada uma das quatro etapas do desenvolvimento do aptasensor impedimétrico: Fabricação e limpeza do eletrodo, sequências dos APTs, o anti-incrustante MCH e finalmente as cianotoxinas, STX e MCLR.

#### **3.1 Fabricação e limpeza do eletrodo de trabalho**

O eletrodo de trabalho foi fabricado sobre substratos de vidro, evaporando sobre eles camadas nanométricas de Cromo (Cr) e Ouro (Au), a continuação, será descrito o processo de limpeza desses substratos de vidro.

##### **3.1.1 Limpeza dos substratos de vidro**

Inicialmente as lâminas de vidro foram lavadas com detergente misturado com água, a fim de remover as gorduras e outras impurezas, para evitar a possibilidade de que resíduos do detergente fiquem nas lâminas de vidro, elas foram enxaguadas com abundante água. Em seguida as lâminas foram colocadas num béquer com água destilada com um separador/espaçador, de forma que uma lâmina não toque em outra. Logo em seguida, elas foram colocadas em banho de ultrassom por 30min para tirar algum possível resto do detergente.

No próximo passo as lâminas de vidro foram colocadas dentro de um béquer contendo acetona, e o mesmo fica em ultrassom por 30 minutos. Logo em seguida, a acetona foi removida e as lâminas recebem borrifadas de água destilada. A etapa anterior foi então repetida com álcool isopropílico. Por fim, o álcool isopropílico foi recolhido e as lâminas foram novamente borrifadas com água destilada e a etapa de ultrassom por 30 minutos foi iterada com água destilada.

Depois desse processo de limpeza descrito acima, as lâminas foram secadas com um jato de nitrogênio e ficaram prontas para evaporar os materiais sobre elas, processo que é descrito na seguinte seção.

##### **3.1.2 Evaporação das camadas de Cromo (Cr) e Ouro (Au)**

As camadas de Cr/Au nas lâminas de vidro (2,5cm x 7cm) foram evaporadas utilizando a técnica de evaporação por feixe de elétrons (elétron-beam). Evaporou-se 5nm de

Cr sobre o vidro para assegurar a aderência da evaporação da camada de 50nm de Au em cima do Cr.

### **3.1.3 Limpeza do eletrodo de trabalho**

O processo de limpeza para o eletrodo de trabalho de Au dividiu-se em três etapas: polimento mecânico, limpeza química e varredura eletroquímica. Foram testados vários métodos de limpeza e combinações deles no eletrodo de trabalho, com o objetivo de avaliar e identificar o mais adequado para o eletrodo de Au. A continuação serão descritos os pormenores de cada método de limpeza.

#### **3.1.3.1 Polimento Mecânico (M)**

O método de limpeza mecânico (M) consistiu num polimento manual dos eletrodos de Au com uma pasta de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em suspensão, de  $0,5\mu\text{m}$  de granulagem, o objetivo foi tirar as gorduras maiores do eletrodo. Para tal efeito, utilizou-se uma flanela macia para uma leve e breve fricção sobre os eletrodos, para não agredir o Au [113]. Após o polimento, os eletrodos foram enxaguados com abundante água, e restos maiores da  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nos eletrodos foram suavemente retirados com um cotonete, para finalmente ser sonicados em água destilada durante 10min para a remoção das partículas residuais de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  da superfície dos eletrodos de Au.

#### **3.1.3.2 Limpeza Química (Q)**

Os processos de limpeza química comparados foram dois:

O primeiro tratamento de limpeza Química 1 (Q1) consistiu na oxidação química de contaminantes adsorvidos e foi efetuado por imersão dos eletrodos de Au numa solução de 50mM de KOH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25% v/v) por um tempo de 10min [114].

A segunda limpeza Química 2 (Q2) foi por imersão dos eletrodos de Au em solução Piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ ) (7:3 v/v) durante 10 minutos [113]. Em ambas as limpezas, após os processos, os eletrodos foram enxaguados com profusas quantidades de água purificada.

#### **3.1.3.3 Limpeza Eletroquímica (EQ)**

As varreduras eletroquímicas por VC são capazes de realizar uma limpeza em eletrodos metálicos, cuja eficiência dependerá da concentração da solução, da taxa e do



número de varreduras e da escolha do intervalo de potenciais aplicados. Foram comparadas duas varreduras eletroquímicas:

A primeira limpeza eletroquímica (EQ1) foi realizada aplicando 50 varreduras sucessivas entre os potenciais redox do ouro, no intervalo de -200mV a -1200mV (vs. Ag/AgCl) em solução aquosa de 50mM de KOH a uma taxa de varredura de 50mV/s [114].

Na segunda varredura eletroquímica (EQ2) o potencial do eletrodo foi varrido 25 vezes de -400mV a 1400mV (vs. Ag/AgCl) a uma taxa de varredura de 100mV/s numa solução de 50mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [113]. Finalmente, em ambas as varreduras, após as limpezas, os eletrodos foram enxaguados com abundante água destilada e são secados com jatos de nitrogênio, ficando prontos para medir o grau de limpeza e para a imobilização do APT.

### 3.1.3.4 Comparação dos métodos de limpeza

A limpeza do eletrodo de trabalho é parte essencial para a fabricação de qualquer biossensor eletroquímico, devido à necessidade de imobilizar as componentes sobre o eletrodo, nesse aptasensor impedimétrico em específico, as componentes são os APTs, o anti-incrustante e as toxinas.

Para fazer a comparação dos processos de limpeza, dividiu-se as limpezas em dois grupos, o Grupo 1 possui a base KOH [114] e o Grupo 2 está associado com o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [113]. Combinações entre métodos de limpeza podem ser feitas só entre limpezas do mesmo grupo, exceto a limpeza M que pode ser aplicada nos dois grupos, a organização dos grupos de limpeza estão detalhados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Organização dos grupos de limpeza 1 e 2

Limpezas	Notação	Grupo 1	Grupo 2
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	M	X	X
KOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Q1	X	
Varredura KOH	EQ1	X	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Piranha)	Q2		X
Varredura H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	EQ2		X

Após a evaporação de Cr/Au sobre as lâminas de vidro, elas passaram uma semana na prateleira no laboratório. Sabe-se que, em condições ambientais de armazenamento em

laboratório, a superfície do ouro é rapidamente coberta de partículas, por isso usamos isso como “contaminação” padrão para nossos testes [115]. No mesmo dia da limpeza, as lâminas de Au foram cortadas para fabricar os eletrodos, nesse processo de corte, os eletrodos sofreram inevitavelmente mais uma contaminação.

A diferença de potencial entre as correntes pico catódicas e anódicas,  $\Delta V$ , foi usada como uma medida da limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo, vista na Figura 3.1, com uma  $\Delta V$  menor indicando uma superfície mais limpa. Teoricamente, para reações de transferência de elétrons como no par  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  em uma superfície de ouro perfeita, a diferença de potencial deveria ser  $\Delta V = 58mV$  [115], e interpretamos qualquer aumento neste valor a ser causado por imperfeições ou contaminações da superfície.

As curvas de resposta em frequência das medições da EIE foram ajustadas ao circuito equivalente de Randles, visto anteriormente, por exemplo, na Figura 2.26b, do qual a resistência de transferência de carga,  $R_{tc}$ , foi extraída. Uma vez que a  $R_{tc}$  é uma medida da resistência encontrada pelos elétrons à medida que fluem entre as espécies redox e a superfície do eletrodo, uma  $R_{tc}$  menor indica uma superfície mais limpa e eletroquimicamente ativa [115].

Figura 3.1 No voltamograma cíclico mostrado, a diferença de potencial das posições das correntes de pico anódica ( $V_{pa}$ ) e catódica ( $V_{pc}$ ), rotuladas como  $\Delta V$ , é usada como medida de limpeza.

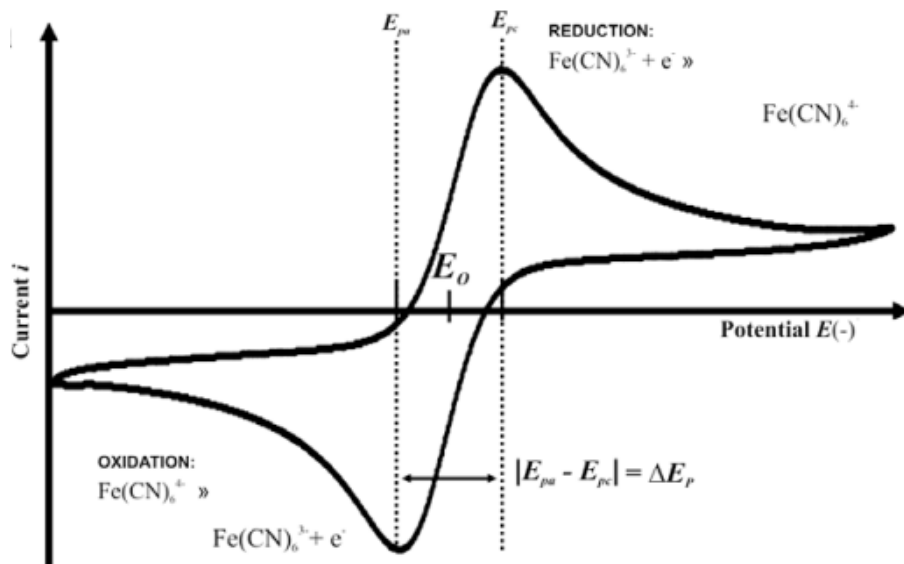


Figura retirada da referência [115]

### 3.1.4 Fabricação da máscara para o eletrodo de trabalho

A máscara do eletrodo de Au foi feita de forma completamente manual, para tal fim, o eletrodo foi coberto por ambos os lados com uma fita dupla face, inerte aos processos eletroquímicos, deixando exposta só uma área de 3mm de diâmetro que foi o eletrodo de trabalho como mostrado na figura 3.2.

Figura 3.2 O eletrodo de trabalho de Au do aptasensor impedimétrico e sua respectiva máscara.



### 3.2 Sequências dos Aptâmeros (APTs)

Um APT foi o elemento de bioreconhecimento utilizado para a detecção da STX nesse trabalho. Para esse propósito, testaram-se duas sequências de APTs específicos para STX, a primeira delas (APT<sup>STX</sup>) foi publicada no ano 2013 por Handy et al. [58] e a segunda (M-30f), mais curta e aprimorada, foi dada conhecer por Zheng et al. [59] no ano 2015. De modo assegurar a imobilização dos APTs sobre os eletrodos de Au, funcionalizaram-se os APTs com tiol em algum dos terminais das sequências de DNA, aproveitando a forte ligação covalente Au-S. Na sequência APT<sup>STX</sup>, o tiol foi colocado no terminal 3', essa funcionalização foi chamada de APT1<sup>STX</sup>; em uma outra tentativa, o tiol foi inserido no extremo 5', funcionalização que foi nomeada de APT2<sup>STX</sup>. Por outro lado, na segunda sequência M-30f, o tiol foi situado na extremidade 3', que por ser a única funcionalização nessa sequência, decidiu-se que ficaria com o mesmo nome. Em todos os casos, além do grupo tiol, os APTs foram funcionalizados com bases poli A de adenina, para manter um espaçamento entre a parte de reconhecimento do APT e o eletrodo de trabalho, com o objetivo de favorecer a imobilização dos APTs. As duas sequências e as três funcionalizações foram encarregadas e compradas à INNOVARE Diagnóstico (Brazil) e são mostradas a seguir:

5'-GGT ATT GAG GGT CGC ATC CCG TGG AAA CAT GTT CAT TGG GCG  
CAC TCC GCT TTC TGT AGA TGG CTC TAA CTC TCC TCT AAA AAA AAA AAA  
AAA AAA-tiol (C3-S-S)-3' = APT1<sup>STX</sup>

5'-tiol-C6-AAA AAA AAA AAA AAA AAA GGT ATT GAG GGT CGC ATC  
CCG TGG AAA CAT GTT CAT TGG GCG CAC TCC GCT TTC TGT AGA TGG CTC  
TAA CTC TCC TCT-3' = APT2<sup>STX</sup>

5'-T TGA GGG TCG CAT CCC GTG GAA ACA GGT TCA TTG AAA AAA AAA  
AA-C<sub>6</sub>S-S-3' = M-30f

Em cada caso, o APT recebido veio em sua forma liofilizada, ele passou por um processo de centrifugação e diluição antes de ser imobilizado na superfície do eletrodo. Primeiro, o APT foi colocado num centrifugador a 1000rpm por 30s, para baixar qualquer resíduo liofilizado que estiver nas paredes ou tampa do tubo do APT. Logo após, foi diluído em uma solução tampão TE (10mM de Tris-pH 7,5 e 1mM de EDTA), o objetivo do tampão TE foi solubilizar o DNA, e para preservar a estrutura da sequência do APT. TE é uma solução tampão comumente usada em biologia molecular, especialmente em procedimentos envolvendo DNA/RNA. "TE" é derivado de seus componentes: Tris, um tampão de pH comum, e EDTA, uma molécula de quelatação (ligação entre moléculas orgânicas e íons metálicos) de cátions como Mg<sup>2+</sup>. Imediatamente depois, o APT foi armazenado em alíquotas de 100 µM (concentração mais estável para guardar no congelador por muito tempo) a -4°C até usá-los.

Dois tipos de imobilizações foram feitas no eletrodo de Au, na primeira por SAMs, o eletrodo foi mergulhado numa solução de APT de 1µM por no mínimo 8h. Na segunda, um volume de 5µL de uma solução de 1µM de APT foi imobilizado por drop-casting no eletrodo de Au, logo em seguida, o eletrodo foi colocado no forno a 37°C por 1h para a evaporação do solvente. Após as imobilizações dos APTs, os eletrodos Au/APTs foram lavados no tampão TE para retirar prováveis ligações não específicas e ficam prontos para a realização das medidas e posterior aderência do anti-incrustante.

### 3.3 6-Mercaptohexanol (MCH)

Depois de cada tipo de imobilização dos APTs, seja por SAMs ou por drop-casting, incubou-se os eletrodos numa solução de 1mM do anti-incrustante MCH em tampão fosfato (10mM; pH 7,5), por 1h, para cobrir os lugares não ativos para detecção na superfície Au/APT, em especial para evitar a bioincrustação da STX nos locais onde não ligou o APT no eletrodo de Au. Em geral, para definir a concentração do MCH, utiliza-se como referência o fator  $10^3$  vezes, que resulta da proporção da concentração do MCH pela concentração do APT, ou seja,  $1mM/1\mu M = 10^3$ , devido que o APT costuma ser o material mais custoso [62]. O MCH foi comprado da Sigma Aldrich, é um componente de álcool tiolado ( $C_6H_{14}OS$ , Figura 3.3) de pequeno tamanho, cuja função principal foi agir como anti-incrustante e ocupar os espaços vazios deixados pelo APT no eletrodo de Au, bem como estabilizar a conformação das SAMs ou a camada por drop-casting dos APTs e melhorar a resistência anti-incrustação do sistema Au/APT/MCH. Após a aderência do MCH por automontagem no eletrodo de Au, os eletrodos Au/APT/MCH foram enxaguados no tampão fosfato para se desfazer de possíveis ligações inespecíficas e ficam prontos para efetuar as medidas eletroquímicas e posterior ligação da STX. A utilização do MCH foi necessária porque a bioincrustação da STX no eletrodo de trabalho perturba/influencia significativamente a confiabilidade e o desempenho do aptasensor, e interfere com a detecção do APT, comprometendo a seletividade e a afinidade de ligação do APT.

Figura 3.3 Estrutura química do anti-incrustante MCH em 2D e 3D. No gráfico em 3D, em cinza os átomos de C, branco H, amarelo S e vermelho O.

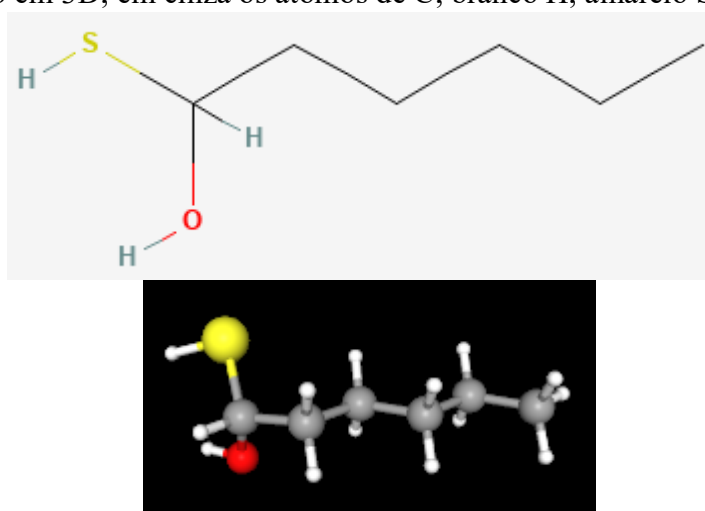


Figura retirada da referência [116]

### 3.4 Ligação da STX

Finalmente, para a ligação da STX no APT, mergulharam-se os eletrodos Au/APT/MCH no tampão de ligação Tris, por 1h, para ver se existe interação com o aptasensor (ver secção 4.4), só depois, os eletrodos foram incubados nas concentrações de interesse da STX, diluídas no mesmo tampão Tris, composto de 50mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150mM de NaCl e 2mM de MgCl<sub>2</sub>, durante 1h, a 4°C. A estrutura final Au/APT/MCH/STX foi então lavada com o Tris, para remover a provável STX não especificamente ligada, ficando pronta para a realização das medidas eletroquímicas.

### 3.5 Microcistina-LR (MCLR)

De igual forma que com a STX, os eletrodos Au/APT/MCH foram mergulhados primeiramente em Tris e posteriormente em soluções de MCLR, em ambos os casos, durante 1h, a 4°C. A especificidade na detecção foi analisada através de experimentos de controle negativo, utilizando a MCLR, que também é uma cianotoxina, mas não é específica para o APT usado no presente trabalho. Para efeitos de comparação, a MCLR foi diluída no mesmo tampão Tris que a STX. O eletrodo resultante Au/APT/MCH/MCLR foi então lavado com o Tris, para remover a MCLR ligada inespecificamente, então, o eletrodo está pronto para as medidas eletroquímicas.

### 3.6 Medidas eletroquímicas

As medidas de VC e EIE foram realizados com um potenciostato/galvanostato/analizador de resposta em frequência AutoLab PGSTAT302N, controlado pelo software NOVA 2.1. Como mostrado na Figura 3.4A, utilizou-se uma célula eletroquímica de três eletrodos: o eletrodo de Au como eletrodo de trabalho; Ag/AgCl saturado com KCl como eletrodo de referência; e uma placa de platina como contra elétrico. Para os experimentos de VC, uma taxa de varredura de 50mV/s foi usada. As medidas de EIE foram registradas com um sinal senoidal de amplitude de 10mV, num potencial de circuito aberto (OCP, do Inglês Open Circuit Potential) de 0,22V/Ag/AgCl, na faixa de frequência entre 100kHz a 100mHz. Todas as medições foram realizadas em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) 10mM e pH 7,4; na presença de uma solução de par redox de 5mM de ferri/ferrocianeto  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ .

### 3.7 Funcionamento do aptasensor impedimétrico

Após a limpeza eletroquímica no eletrodo de trabalho, imobilizou-se o M-30f (por SAMs ou drop-casting) sobre o eletrodo de Au, como mostrado na Figura 3.4Bi), pode-se apreciar que o APT (M-30f) não cobre totalmente a superfície do eletrodo, então para preencher esses sítios vazios foi necessário utilizar o anti-incrustante MCH, como se pode observar na Figura 3.4Bii), essa etapa produziu uma curva de impedância, como observado na Figura 3.4C (esquerda em verde) antes da ligação da STX. Finalmente, quando a ligação da STX aconteceu produz uma mudança na carga e/ou na conformação do M-30f [30], como mostrado na Figura 3.4Biii), essa ligação gerou uma diminuição na curva de impedância, como visto na Figura 3.4C (direita em azul). Esse decréscimo na curva de impedância foi utilizado para detectar a STX e resultou ser proporcional à concentração da STX.

Figura 3.4 A. Célula eletroquímica B. Etapas do aptasensor impedimétrico i) Au/M-30f, ii) Au/M-30f/MCH e iii) Au/M-30f/MCH/STX C. Gráficos de impedância antes e depois da detecção da STX.

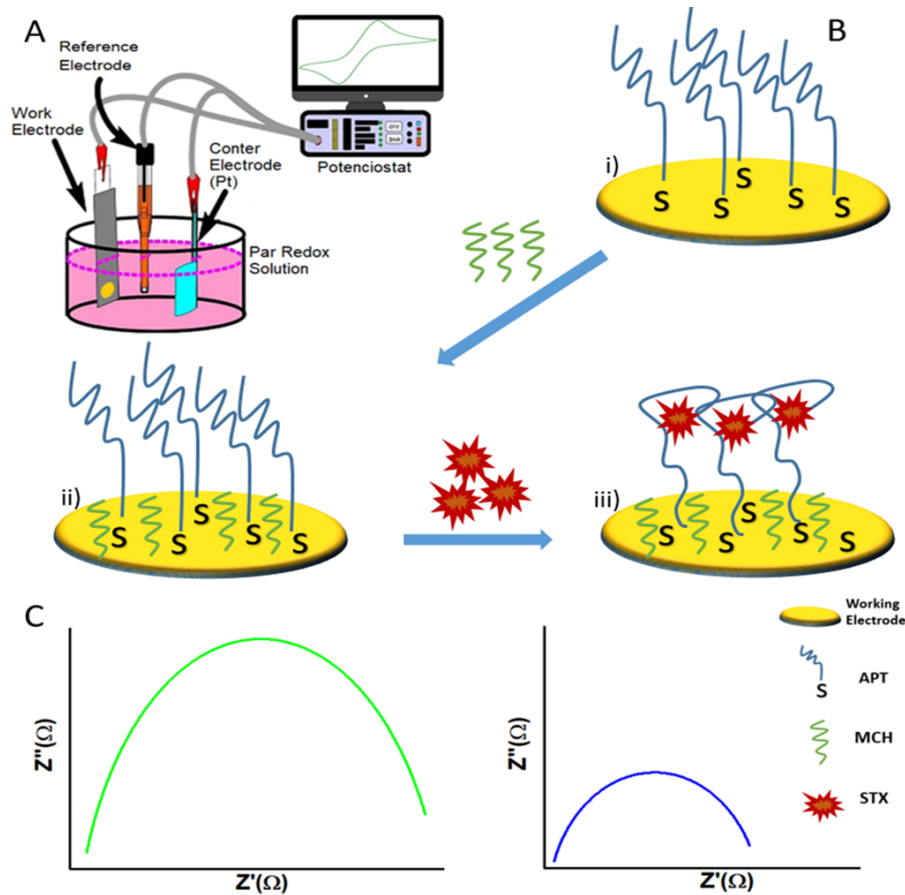


Figura retirada da referência [74]

## 4 RESULTADOS

Nesse capítulo, de caráter expositivo-argumentativo, apresenta-se os resultados e discussões, divididos nas quatro etapas do desenvolvimento do aptasensor impedimétrico: um estudo sobre os métodos de limpeza no eletrodo de trabalho, a imobilização dos APTs, a aderência do MCH e finalmente a detecção específica da STX.

### 4.1 Estudo sobre os métodos de limpeza no eletrodo de trabalho

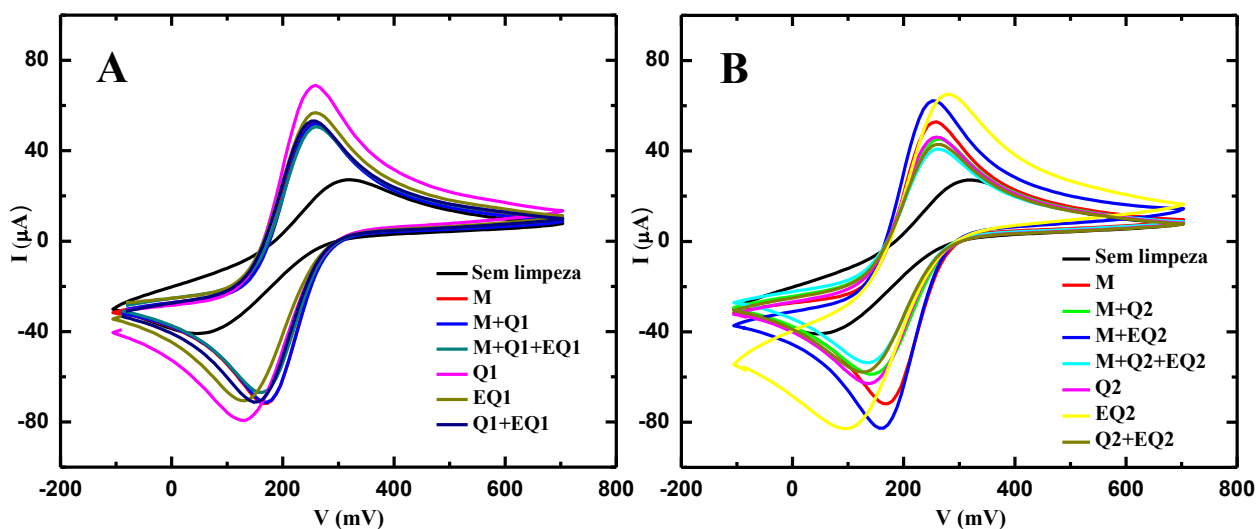
Sabe-se que um dos requisitos para imobilizar os elementos da matriz de detecção de biossensor eletroquímico no eletrodo de trabalho, é a limpeza desse eletrodo, nesse trabalho, um eletrodo de Au. Na secção 3.1.3, apresentaram-se vários métodos de limpeza testados, entre eles, uma limpeza mecânica M, duas limpezas químicas Q1 e Q2 e duas varreduras eletroquímicas EQ1 e EQ2. O objetivo foi fazer um estudo de comparação desses métodos de limpeza, bem como combinações deles no eletrodo de trabalho, para avaliar e identificar a combinação de limpeza mais adequada e menos agressiva para o eletrodo de Au.

Para avaliar cada método de limpeza e as combinações deles, consideraram-se dois parâmetros: o primeiro foi o cálculo da diferença de potencial ( $\Delta V$ ) entre os picos de oxidação-redução gerados por VC. O menor valor obtido para  $\Delta V$  é um indicador de uma melhor limpeza do eletrodo. O segundo parâmetro foi a determinação da resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ), a partir das medidas de EIE num diagrama de Nyquist, por intermédio de um ajuste das curvas de impedância utilizando um CEE de Randles (Figura 2.25e), onde quanto menor a  $R_{tc}$ , significa um eletrodo mais limpo. Em ambos os parâmetros, foram comparados os eletrodos limpos e suas combinações com um eletrodo sem limpeza nenhuma.

As curvas de VC das limpezas e suas combinações do grupo 1 de KOH são mostradas na Figura 4.1A, observa-se que todas as VCs produzem uma diminuição apreciável da diferença de potencial  $\Delta V$  entre os picos de oxi-redução, com respeito à  $\Delta V$  do eletrodo sem limpar, distinguindo-se as limpezas Q1 e EQ1 como as menos limpas (maior  $\Delta V$ ). Referente à limpeza mais eficiente, é difícil estabelecer a olho nu na figura qual é a menor  $\Delta V$ , pelo fato de estarem as curvas muito próximas, então, os cálculos de  $\Delta V$  e  $\Delta V\%$  foram determinados do gráfico e um resumo deles é apresentado na Tabela 4.1.



Figura 4.1 As curvas de VC das limpezas e suas combinações: A. Para o grupo 1 de KOH B. Para o grupo 2 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



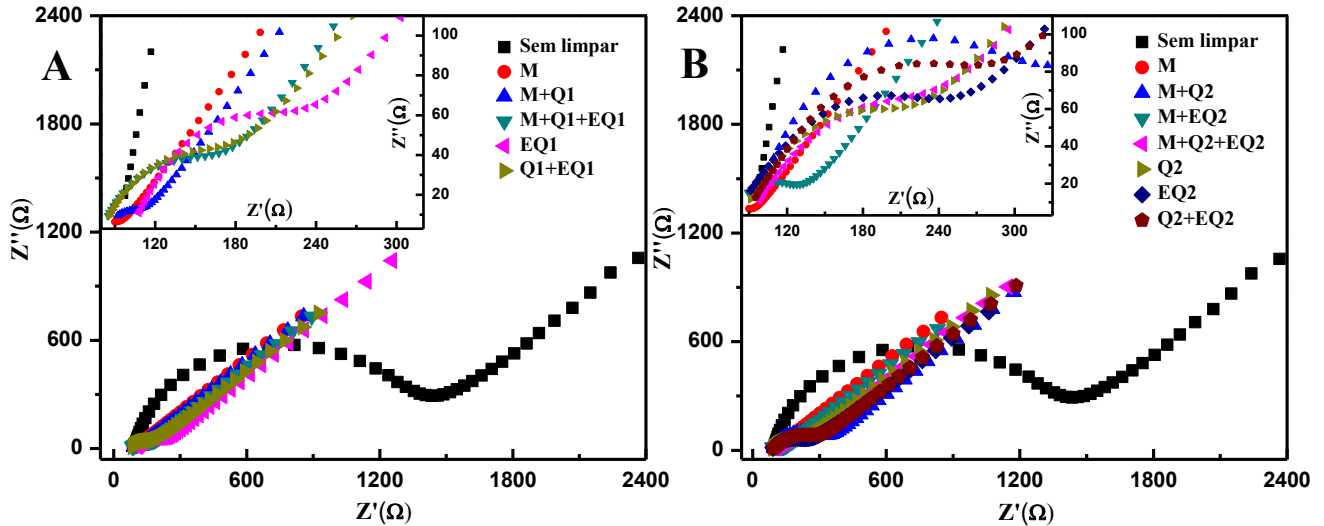
Na Figura 4.1B, mostra-se os voltamogramas para cada uma das combinações de limpeza do Grupo 2 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, onde se pode distinguir que esse grupo 2 de limpezas mostra uma redução da diferença de potencial  $\Delta V$  entre os picos redox, quando comparado com a  $\Delta V$  do eletrodo sem limpeza. Destaca-se com o menor decremento  $\Delta V\%$  (pior limpeza) a limpeza EQ2. Com respeito a melhor limpeza, sobressaem os processos M e M+EQ2 com os menores  $\Delta V$ . Valores de  $\Delta V$  e  $\Delta V\%$  foram calculados para todas as limpezas e resumidos na Tabela 4.1.

Os diagramas de Nyquist do grupo 1 de limpezas e suas combinações são mostrados na Figura 4.2A, pode-se observar que todas as limpezas desse grupo mostram uma diminuição da  $R_{tc}$  nas curvas de impedância com relação à  $R_{tc}$  do eletrodo sem limpar. Para distinguir quais foram as melhores limpezas, foi necessário maximizar as curvas de Nyquist e inseri-las. A imagem inserida demonstra que a menor  $R_{tc}$  (melhor limpeza) foi da limpeza M, seguida da combinação M+Q1 e das limpezas M+Q1+EQ1 e Q1+EQ1. Pelo contrario, a pior limpeza (maior  $R_{tc}$ ) foi a EQ1. Um resumo dos valores da  $R_{tc}$  para todas as curvas de impedância é apresentado na Tabela 4.1.

Na figura 4.2B, mostra-se as curvas de Nyquist da EIE para as limpezas e combinações do grupo 2, conclui-se que todas as limpezas desse grupo produzem uma redução na  $R_{tc}$  das curvas de impedância, quando comparada com a  $R_{tc}$  do eletrodo sem limpar. Uma maximização das curvas de Nyquist das limpezas foi inserida com o objetivo de apreciar que a limpeza M continua sendo a melhor (menor  $R_{tc}$ ), seguida da M+EQ2, depois a combinação M+Q2+EQ2 e por último as Q2 e EQ2. Observa-se que a maior  $R_{tc}$  (pior

limpeza) foi para o processo M+Q2. O resumo da  $R_{tc}$  para cada curva de impedância é apresentado na Tabela 4.1.

Figura 4.2 As curvas de Nyquist da EIE das limpezas e suas combinações: A. Para o grupo 1 de KOH B. Para o grupo 2 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Na Tabela 4.1, pode-se identificar que os maiores decrementos de  $\Delta V\%$  e  $\Delta R_{tc}\%$  foram encontrados para as limpezas M e M+Q1, que seriam os melhores métodos de limpeza, porém, reparou-se que esses valores foram obtidos depois de um intenso polimento M com alumina, que terminou rachando o eletrodo de Au, afetando o desempenho do aptasensor. É possível observar que a menor diminuição  $\Delta V\%$  foi para o processo EQ2, e que o menor decréscimo  $\Delta R_{tc}\%$  foi para a limpeza M+Q2, ou seja, esses exibem os piores processos de limpeza. A justificativa para esses dois últimos resultados, pode estar no fato de ter observado que os processos que envolviam as limpezas Q2 e EQ2 produziam um leve escurecimento do Au, o que significa uma oxidação do eletrodo, vista também por Fischer et al. [115], possivelmente pela presença do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No entanto, a combinação M+EQ2 apresenta bons decrementos  $\Delta V\%$  e  $\Delta R_{tc}\%$ , talvez devido ao polimento M. Um resultado interessante foi produzido pela tripla combinação M+Q1+EQ1, que mostrou diminuições  $\Delta V\%$  e  $\Delta R_{tc}\%$  razoáveis, onde com um leve polimento M (tentou-se não rachar o Au) seguido das limpezas Q1+EQ1 que não produziram a oxidação no eletrodo, conseqüentemente essas três últimas limpezas no Au foram escolhidas para desenvolver sobre o eletrodo o aptasensor impedimétrico.

Tabela 4.1 O resumo dos resultados de  $\Delta V$  e  $R_{tc}$  para todas as limpezas e suas combinações com suas respectivas diminuições  $\Delta V\%$  e  $\Delta R_{tc}\%$  com relação ao eletrodo sem limpar.

Limpezas e Combinações	$\Delta V$ (mV)	$\Delta V\%$	$R_{tc}$ ( $\Omega$ )	$\Delta R_{tc}\%$
Sem limpar	277		1500	
M	88	-68.23	5	-99.67
Q1	127	-54.15	-	-
EQ1	127	-54.15	203	-86.47
M+Q1	88	-68.23	20	-98.67
M+EQ1	-	-	-	-
Q1+EQ1	111	-59.93	145	-90.33
M+Q1+EQ1	96	-65.34	136	-90.93
Q2	119	-57.04	212	-85.87
EQ2	190	-31.41	233	-84.47
M+Q2	127	-54.15	317	-78.87
M+EQ2	96	-65.34	47	-96.87
Q2+EQ2	135	-51.26	304	-79.73
M+Q2+EQ2	127	-54.15	224	-85.07

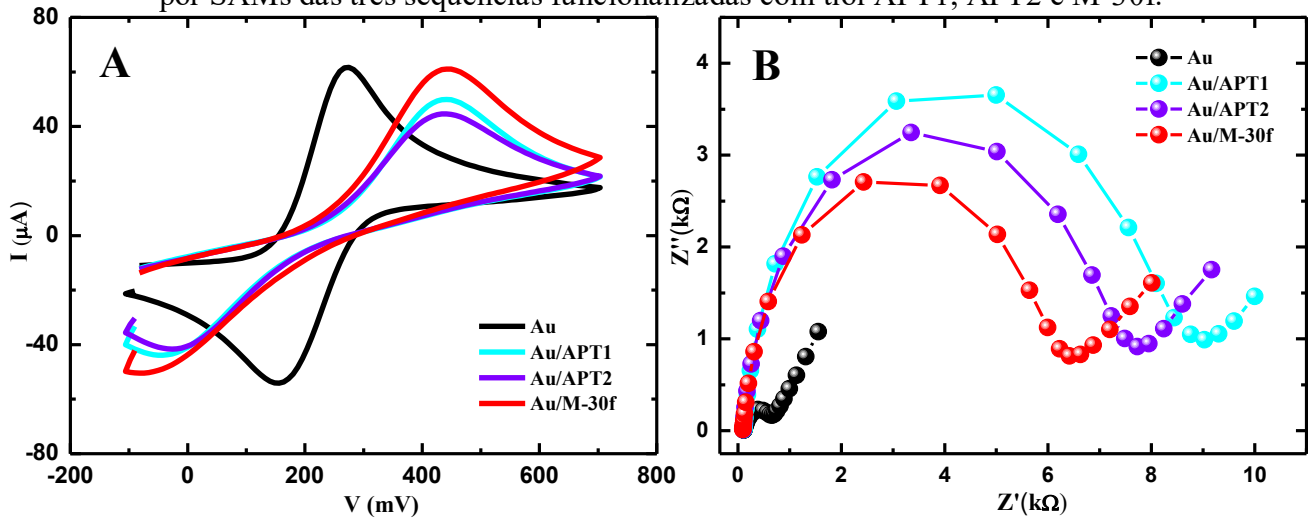
#### 4.2 Imobilização dos APTs

Após a limpeza do eletrodo de trabalho, a superfície de Au fica pronta para a imobilização das sequências de APTs. As duas sequências de APTs testadas para imobilização foram: APT<sup>STX</sup> e M-30f, para três diferentes funcionalizações com tiol APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f (Ver secção 3.2). Com respeito à forma de imobilização, testaram-se duas técnicas, a imobilização por SAMs e por drop-casting. Os resultados das caracterizações por VC e EIE para essas imobilizações dos APTs são apresentados nessa parte.

Os voltamogramas cíclicos das imobilizações sobre o eletrodo de Au por SAMs das três funcionalizações com tiol APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f, com uma concentração de 1 $\mu$ M, são mostradas na Figura 4.3A. Devido à imobilização dos APTs na superfície do eletrodo, observa-se que os três picos de oxidação têm um deslocamento para a direita em relação ao pico anódico do eletrodo de Au limpo. Pode-se distinguir também que a imobilização dos APTs produz uma diminuição na corrente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) quando comparado com a  $i_{pa}$

do eletrodo de Au, sendo esse decremento maior para as funcionalizações APT1 e APT2, e menor para a sequência M-30f. Esses decrementos nas correntes Faradaicas acontecem porque os eletrodos tornaram-se mais resistentes por causa da ligação dos APTs.

Figura 4.3 A. Voltamogramas cíclicos e B. Diagramas de Nyquist das imobilizações por SAMs das três sequências funcionalizadas com tiol APT1, APT2 e M-30f.

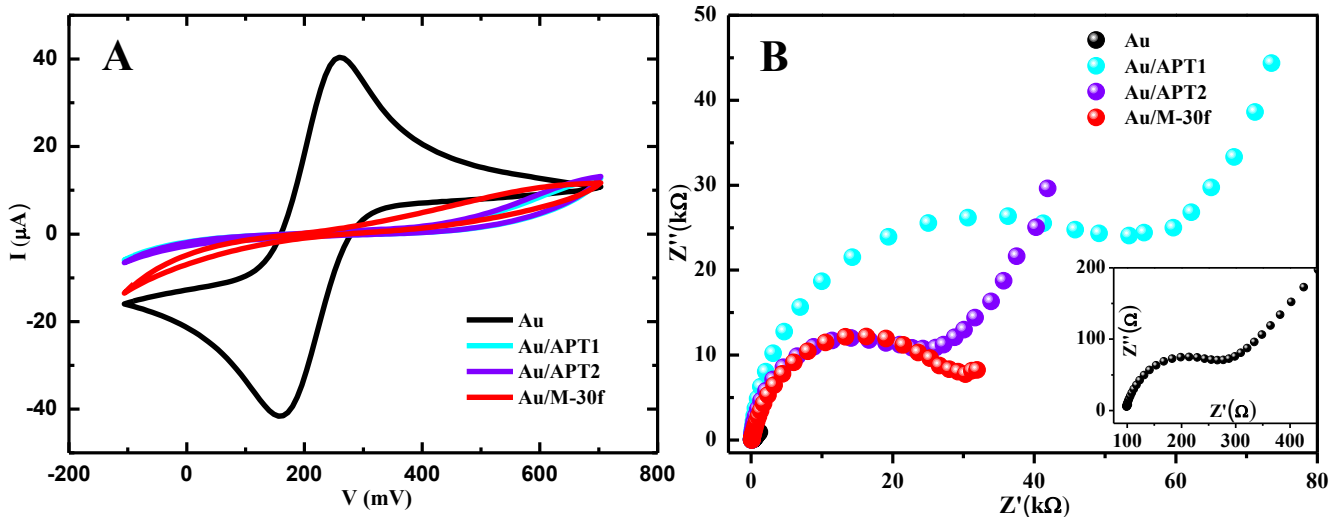


As curvas de impedância das imobilizações dos APTs por SAMs sobre o eletrodo de trabalho para as três funcionalizações com tiol APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f, numa concentração de 1µM, são apresentadas na Figura 4.3B. Pode-se observar um incremento da resistência de transferência de carga ( $\Delta R_{tc}$ ) para as três funcionalizações quando comparadas com a resistência de transferência de carga do eletrodo de Au,  $R_{tc(Au)}$ , indicando que o eletrodo tornou-se mais resistivo, resultado da imobilização dos APTs. Nesse sentido, a imobilização do APT1 funcionalizado, resulta ser mais resistiva, devido à sua maior  $R_{tc}$ ; enquanto com menores  $R_{tc}$ , identificam-se as sequencias funcionalizadas APT2 e M-30f, respectivamente. O  $\Delta R_{tc}$  dos APTs com relação à  $R_{tc(Au)}$  são resumidos na Tabela 4.2.

Na Figura 4.4A, mostra-se as curvas de VC das imobilizações por drop-casting das três sequências funcionalizadas APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f, para uma concentração de 1µM, na superfície do eletrodo de Au. Pode-se concluir que as três sequências têm uma drástica diminuição da corrente Faradaica, com relação à VC do Au limpo, por tal motivo, torna-se difícil apreciar os picos redox das VCs. Observa-se, também que a diminuição da corrente Faradaica na sequência M-30f é menor que nas sequências APT1<sup>STX</sup> e APT2<sup>STX</sup>, acredita-se que por causa da sequência M-30f ser mais curta ela se torna menos resistiva à transferência de elétrons da solução. Similar comportamento foi observado nas VCs das imobilizações por SAMs (Figura 4.3A). Esse decremento extremo da corrente Faradaica nas curvas de VC

acontece porque a reação eletroquímica é inibida, resultado da repulsão eletrostática entre os APTs imobilizados e os ânions da solução eletrolítica  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ , ambos carregados negativamente, dificultando o acesso do par redox à superfície do eletrodo de Au.

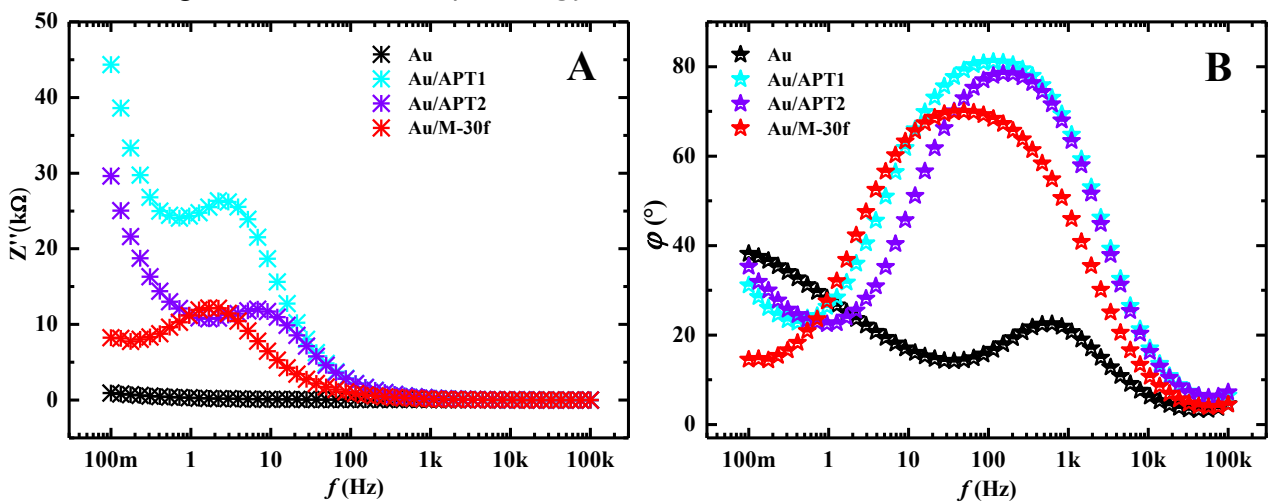
Figura 4.4 A. VCs e B. Diagramas de Nyquist das imobilizações por drop-casting das três sequências funcionalizadas com tiol APT1, APT2 e M-30f.



Os diagramas de Nyquist da Figura 4.4B, representam as impedâncias das imobilizações dos APTs por drop-casting para uma concentração de  $1\mu M$  sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A imagem reflete que as curvas das três sequências funcionalizadas apresentam um enorme incremento  $\Delta R_{tc}$  da ordem de  $10^4\Omega$  na resistência de transferência de carga dos APTs,  $R_{tc(APT)}$ , com respeito à  $R_{tc(Au)}$ , mostrada no gráfico inserido na Figura 4.4B. Esse aumento  $\Delta R_{tc}$  indica que os eletrodos se tornaram mais resistivos devido às imobilizações dos APTs, sendo o maior  $\Delta R_{tc}$  para a sequência APT1, e menor para as sequências APT2 e M-30f. Os incrementos  $\Delta R_{tc}$  foram calculados e são apresentados na Tabela 4.2. Uma diferença clara nas curvas de impedância acontece a baixas frequências, na parte difusiva (impedância de Warburg), lado direito dos semicírculos. Essa diferença, distingue-se melhor num diagrama de Bode, como na Figura 4.5A, onde é possível ver a evolução da curva de  $Z''$  em função da frequência ( $f$ ). No gráfico, pode-se observar que entre as frequências 100-200mHz os valores de  $Z''$  da sequência M-30f são muito menores que para os valores  $Z''$  das sequências APT1 e APT2. Acredita-se que isso acontece por M-30f ser uma sequência mais curta. O outro diagrama de Bode é apresentado na Figura 4.5B, no qual se mostra como as curvas dos ângulos de fase ( $\varphi$ ) das três sequências funcionalizadas APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f evoluem com a frequência. Nessa evolução, as três sequências têm um

comportamento de sela e atingem um máximo da fase na frequência do ponto de sela, chamada de frequência pico ( $f_{pico}$ ), essa  $f_{pico}$  e sua respectiva  $\varphi$  são menores para a sequência M-30f, em relação às  $f_{pico}$  e  $\varphi$  das sequências APT1 e APT2. Como visto na seção 3.2 dos materiais e métodos, essa diferença na  $f_{pico}$  e  $\varphi$  da sequência M-30f pode-se dever ao fato de ser mais curta com relação às sequências APT1 e APT2.

Figura 4.5 Os diagramas de Bode das imobilizações por drop-casting das três funcionalizações com tiol APT1, APT2 e M-30f. A.  $Z''$  vs frequência ( $f$ ) em escala logarítmica B. A fase ( $\varphi$ ) vs  $\log f$ .



A Tabela 4.2, resume os valores dos  $\Delta R_{tc}$ , calculados a partir de  $\Delta R_{tc} = R_{tc(APT)} - R_{tc(Au)}$ , para as três sequências funcionalizadas APT1<sup>STX</sup>, APT2<sup>STX</sup> e M-30f com os dois tipos de imobilizações utilizadas, SAMs e drop-casting. Cada  $R_{tc}$  foi calculada a partir de um ajuste das curvas de impedância utilizando um CEE de Randles, mostrado anteriormente na Figura 2.26b. Nos resultados, uma desproporção torna-se evidente, o aumento  $\Delta R_{tc}$  para a imobilização por drop-casting atinge valores de 4-8 vezes maior do que por SAMs. Outra diferença que deve ser ressaltada são as grandes incertezas da imobilização por drop-casting, fluando entre 1,39k $\Omega$  - 2,05k $\Omega$ , produto da formação de filmes irregulares, típico desse tipo de deposição. Depois de testar as três sequências funcionalizadas dos APTs, a sequência M-30f foi escolhida para continuar esse trabalho, por ser mais curta e principalmente por possuir uma afinidade 30 vezes maior para STX, segundo Zheng et al.[59] (ver a seção 3.2 dos materiais).

Tabela 4.2 Os valores de  $\Delta R_{tc}$  das imobilizações dos APTs por SAMs e drop-casting, utilizando  $\Delta R_{tc} = R_{tc(APT)} - R_{tc(Au)}$  e o ajuste das curvas com o CEE de Randles.

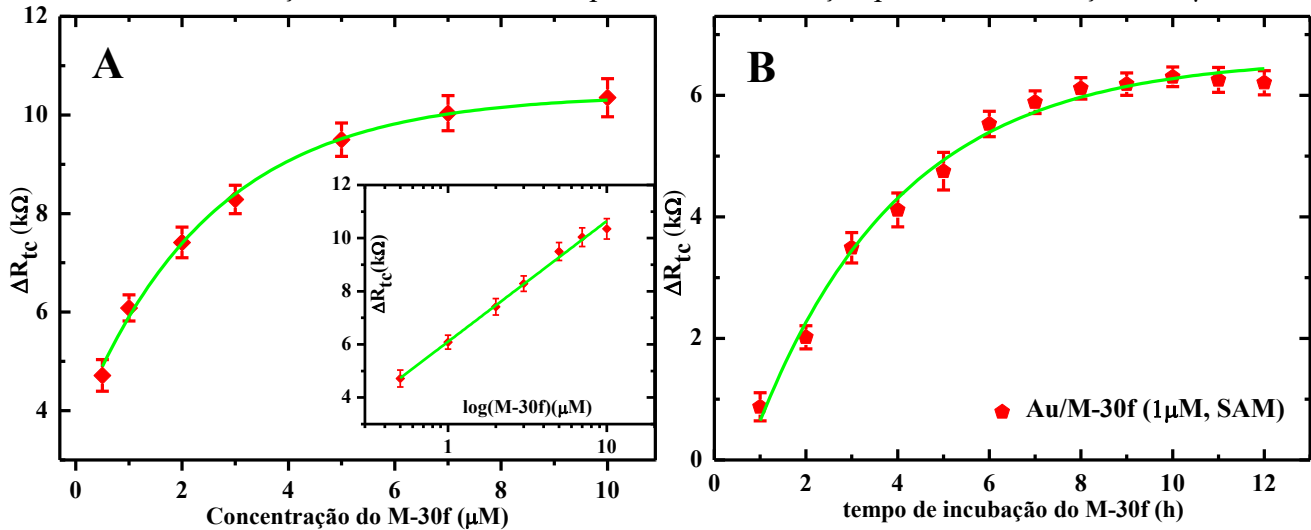
Imobilização dos APTs		$\Delta R_{tc} (k\Omega)$
SAM	APT1	$9,142 \pm 0,420$
	APT2	$7,860 \pm 0,385$
	M-30f	$6,254 \pm 0,301$
Drop-casting	APT1	$71,438 \pm 2,050$
	APT2	$30,950 \pm 1,645$
	M-30f	$31,389 \pm 1,390$

Uma otimização indispensável, para um bom funcionamento do biossensor impedimétrico, era estabelecer qual deveria ser a concentração do ideal do M-30f. Na Figura 4.6A, mostra-se os incrementos  $\Delta R_{tc}$  para diferentes concentrações do M-30f, após um intervalo de tempo de 12h para a formação de SAM. Pode-se identificar que entre as concentrações de 0,5-5 $\mu$ M acontecem incrementos  $\Delta R_{tc}$  proporcionais aos aumentos da concentração do M-30f, porém, entre as concentrações 5-10 $\mu$ M os aumentos  $\Delta R_{tc}$  são menores, em relação aos incrementos  $\Delta R_{tc}$  das concentrações mais baixas. Acredita-se que esse comportamento ocorreu por causa da saturação do eletrodo, devido às concentrações elevadas do M-30f. No gráfico semi-log inserido, temos os  $\Delta R_{tc}$  versus o logaritmo da concentração do APT,  $\log(M - 30f)$ , exibindo que  $\Delta R_{tc}$  varia de forma linear com os logaritmos das concentrações, de acordo com a equação  $\Delta R_{tc} = 4,5 \log(M - 30f) + 6,1$ . Neste gráfico inserido, fica mais evidente que os  $\Delta R_{tc}$  para as últimas concentrações entre 5-10 $\mu$ M estão mais próximos, por causa de ser menores, quando comparados com os  $\Delta R_{tc}$  das concentrações iniciais, como foi mencionado acima. Dentre todas essas concentrações, decidiu-se utilizar a concentração de 1 $\mu$ M, visto que tem um  $\Delta R_{tc}$  considerável, em torno de 6k $\Omega$ , além de ser uma concentração baixa e conseqüentemente econômica e muito utilizada na literatura [52, 56, 57].

Na Figura 4.6B, pode-se visualizar os  $\Delta R_{tc}$  para a imobilização por SAMs do M-30f, com a concentração selecionada de 1 $\mu$ M, onde é possível avaliar o tempo mínimo necessário para a saturação da área ativa do eletrodo de trabalho. No gráfico distingue-se que entre 1-3h se produzem os maiores  $\Delta R_{tc}$ , seguidamente, entre 4-7h os  $\Delta R_{tc}$  continuam aumentando, porém, em menor proporção que as primeiras horas, finalmente entre 8-12h se observa pequenas diferenças entre os  $\Delta R_{tc}$ , um sinal de que a área do eletrodo de Au atingiu a

saturação devido à formação de SAMs do M-30f. Com base neste resultado, 8h foi o tempo mínimo escolhido para a imobilização por SAMs do M-30f na concentração de  $1\mu\text{M}$ .

Figura 4.6 Optimização da etapa de imobilização por SAMs do M-30f. A. Para várias concentrações do M-30f. B. Tempo ideal de incubação para a concentração de  $1\mu\text{M}$ .



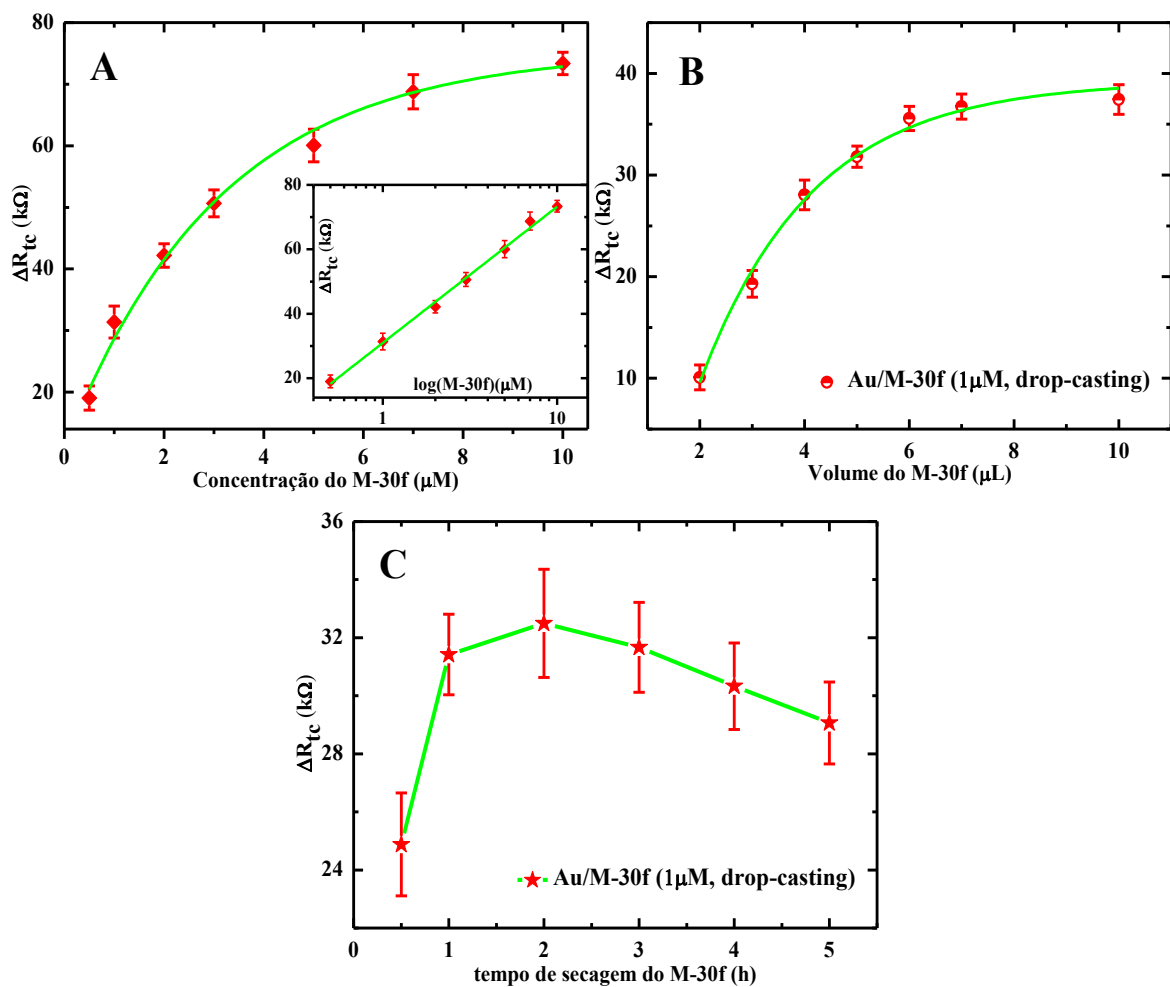
A optimização para a imobilização por drop-casting da sequência do M-30f foi também necessária, para esse efeito, testou-se volumes de  $5\mu\text{L}$  para as concentrações entre  $0,5-10\mu\text{M}$ . Os incrementos  $\Delta R_{tc}$  versus as concentrações são mostradas na Figura 4.7A, onde é possível distinguir que entre as concentrações de  $0,5-5\mu\text{M}$  os aumentos  $\Delta R_{tc}$  são maiores que para as concentrações entre  $5-10\mu\text{M}$ . Tal diferença, aprecia-se melhor no gráfico inserido, onde os  $\Delta R_{tc}$  variam linearmente com o  $\log(M - 30f)$  das concentrações, conforme a equação  $\Delta R_{tc} = 4,2 \log(M - 30f) + 3,1$ . O gráfico inserido demonstra que os  $\Delta R_{tc}$  das últimas três concentrações entre  $5-10\mu\text{M}$ , estão muito mais próximos que para as concentrações iniciais. Essa proximidade pode ser atribuída ao impedimento estérico gerado pela formação inicial das camadas por drop-casting do M-30f, que impediriam novas ligações eficazes do M-30f no eletrodo [71]. Dado que todas as concentrações mostram um  $\Delta R_{tc}$  considerável e devido a que utilizar uma concentração alta entre  $7-10\mu\text{M}$  onde se observa uma saturação da imobilização seria oneroso, decidiu-se utilizar uma concentração de  $1\mu\text{M}$ , que corresponde à mesma concentração utilizada na imobilização por SAMs. Além disso, é mais econômico e um valor de concentração muito utilizada na literatura [52, 56, 57].

Na Figura 4.7B, mostra-se os aumentos  $\Delta R_{tc}$  com uma concentração de  $1\mu\text{M}$  do M-30f para diferentes volumes, no gráfico identifica-se que existe um  $\Delta R_{tc}$  em torno de  $10\text{k}\Omega$  entre os volumes de  $2-3\mu\text{L}$  e  $3-4\mu\text{L}$ , e que a taxa de crescimento de  $\Delta R_{tc}$  começa ser menor



entre os volumes de 4-6 $\mu$ L. Entre os volumes de 6-10 $\mu$ L, não existe quase diferença entre os incrementos  $\Delta R_{tc}$ , sinal que atingiu a saturação no eletrodo, devido a maiores volumes da solução do M-30f. Com base nessa otimização do volume, escolheu-se o valor de 5 $\mu$ L, visto que tem um  $\Delta R_{tc}$  em torno de 30k $\Omega$  e não seria necessário um tempo prolongado para evaporar o solvente. Conseqüentemente, foi necessário estudar o tempo de evaporação do solvente na estufa a 37 $^{\circ}$ C, para a concentração de 1 $\mu$ M e um volume de 5 $\mu$ L. A Figura 4.7C mostra o gráfico da otimização do tempo de evaporação do solvente, que reflete um rápido  $\Delta R_{tc}$  na primeira 1/2h de evaporação, seguido de aumentos  $\Delta R_{tc}$  similares entre 1-3h, para 3h em diante, a tendência do  $\Delta R_{tc}$  é diminuir, acredita-se que as ligações do M-30f com o eletrodo de Au começam degradar por causa da exposição prolongada ao calor e terminam desligando do Au.

Figura 4.7 Otimização da imobilização por drop-casting do M-30f. A. Para várias concentrações do M-30f. B. Para diferentes volumes do M-30f na concentração de 1 $\mu$ M. C. O tempo de evaporação ideal do M-30f para a concentração de 1 $\mu$ M e o volume de 5 $\mu$ L.



É importante ressaltar, as grandes incertezas da imobilização por drop-casting do M-30f, que se tornam mais evidentes na Figura 4.7C, por causa de estar num intervalo menor. Tal característica é típica desse tipo de imobilização, ou seja, dificilmente um filme do M-30f é igual ao anterior, produto da extrema irregularidade da deposição devido a uma solução densa que não se espalha uniformemente sobre a superfície.

Finalmente, as imobilizações por SAMs ou drop-casting do M-30f, deixam pequenos espaços sem preencher na área do eletrodo de trabalho, esses espaços precisam ser ocupados por algum anti-incrustante inerte às toxinas alvo, porque senão gerariam bioincrustações com ligações inespecíficas das toxinas na superfície do eletrodo, no seguinte item, apresenta-se os resultados com o anti-incrustante escolhido.

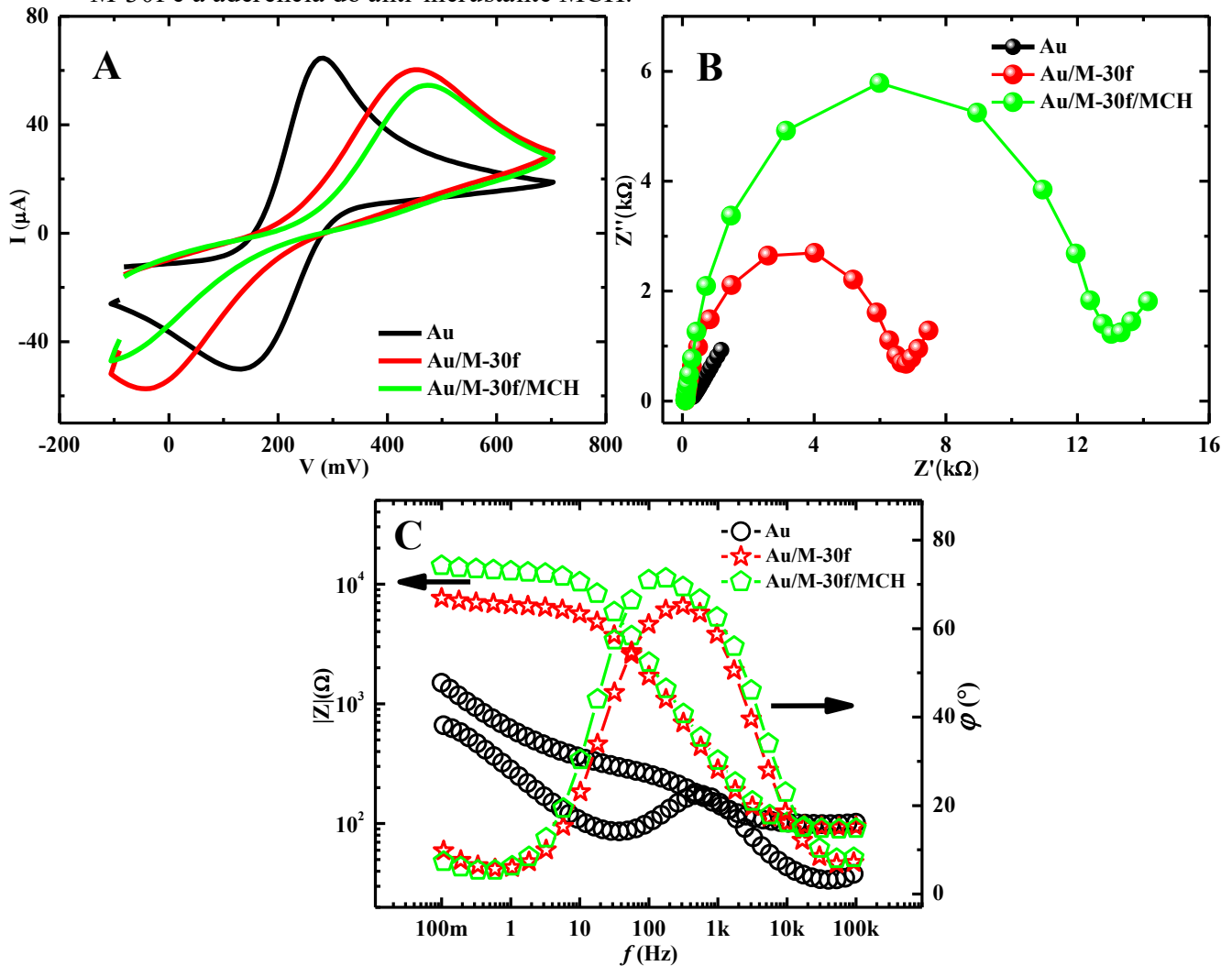
### 4.3 Aderência do MCH

O anti-incrustante MCH foi utilizado com a finalidade de preencher os espaços vazios da área do eletrodo de Au que não foram cobertos com as imobilizações por SAMs ou drop-casting do M-30f. A continuação apresenta-se os resultados da aderência do MCH no eletrodo de trabalho:

Começamos pela Figura 4.8A, onde se mostra os voltamogramas cíclicos para as até agora, três etapas do aptasensor, a limpeza do eletrodo de Au, a imobilização por SAMs do M-30f (Au/M-30f) e a aderência do anti-incrustante MCH (Au/M-30f/MCH). Do gráfico é possível observar um deslocamento para a direita dos picos de oxidação para o Au/M-30f, podendo se distinguir um deslocamento ainda maior para o Au/M-30f/MCH, quando comparados com o pico anódico do eletrodo de Au. Também se pode identificar uma diminuição na corrente Faradaica da parte anódica para o Au/M-30f e um decremento maior ainda para o Au/M-30f/MCH. Esse decremento na  $i_{pa}$  é sinal de uma menor transferência dos elétrons da solução eletrolítica, produto de uma maior resistência (impedância) no eletrodo, devido à ligação do M-30f primeiro e do MCH em segundo lugar.

As Curvas de Nyquist são mostradas na Figura 4.8B, percebe-se que a curva de aderência do MCH (Au/M-30f/MCH) tem um incremento  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$  de quase o dobro em relação à imobilização do M-30f por SAMs (Au/M-30f), sendo evidente que o eletrodo tornou-se mais resistente devido ao preenchimento com MCH dos espaços vazios deixados pelo M-30f. Detalhes dos valores das  $R_{tc}$  são apresentados na Tabela 4.3.

Figura 4.8 A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode, para três etapas do aptasensor, a limpeza do eletrodo de Au, a imobilização por SAMs do M-30f e a aderência do anti-incrustante MCH.



Se o desejo é ver as curvas de impedância em função da frequência ( $f$ ), um diagrama de Bode é a melhor opção, como na Figura 4.8C, onde se pode observar no eixo  $x$  a  $f$  em escala  $\log$  e no eixo  $y$  do lado esquerdo do gráfico o módulo da impedância ( $|Z|$ ) em  $\log$  também. Consegue-se distinguir que em frequências menores entre 100-300mHz, as curvas Au/M-30f e Au/M-30f/MCH tem uma leve descida, que se estende e é muito mais pronunciada na curva do Au entre as frequências de 100m-1Hz. Esse declínio exibe a difusão da reação eletroquímica, representada pelo lado direito do diagrama de Nyquist, especificamente os rabos das curvas na Figura 4.8B. Para frequências entre 1-10Hz, o valor do módulo  $|Z|$  é maior para a etapa Au/M-30f/MCH do que para Au/M-30f, ambos da ordem de  $10^4\Omega$ . Esses são ainda maiores do que para o eletrodo de Au limpo, que é da ordem de

$10^3 \Omega$ . Tais diferenças podem ser vistas também no diagrama de Nyquist (Figura 4.8B), na região semicircular, porém, sem a  $f$  em forma explícita. Entre as frequências 10-10kHz, o diagrama de Bode mostra a parte capacitiva das curvas, apresentado só uma leve diferença entre 10-30Hz para as curvas do Au/M-30f/MCH e Au/M-30f. Essa pequena diferença era esperada, pois o aptasensor desenhado é Faradaico, ou seja, foi desenvolvido para mostrar as alterações da resistência (impedância) ao passo da corrente, provocada pela solução eletrolítica quando aplicado um potencial AC em cada etapa do dispositivo.

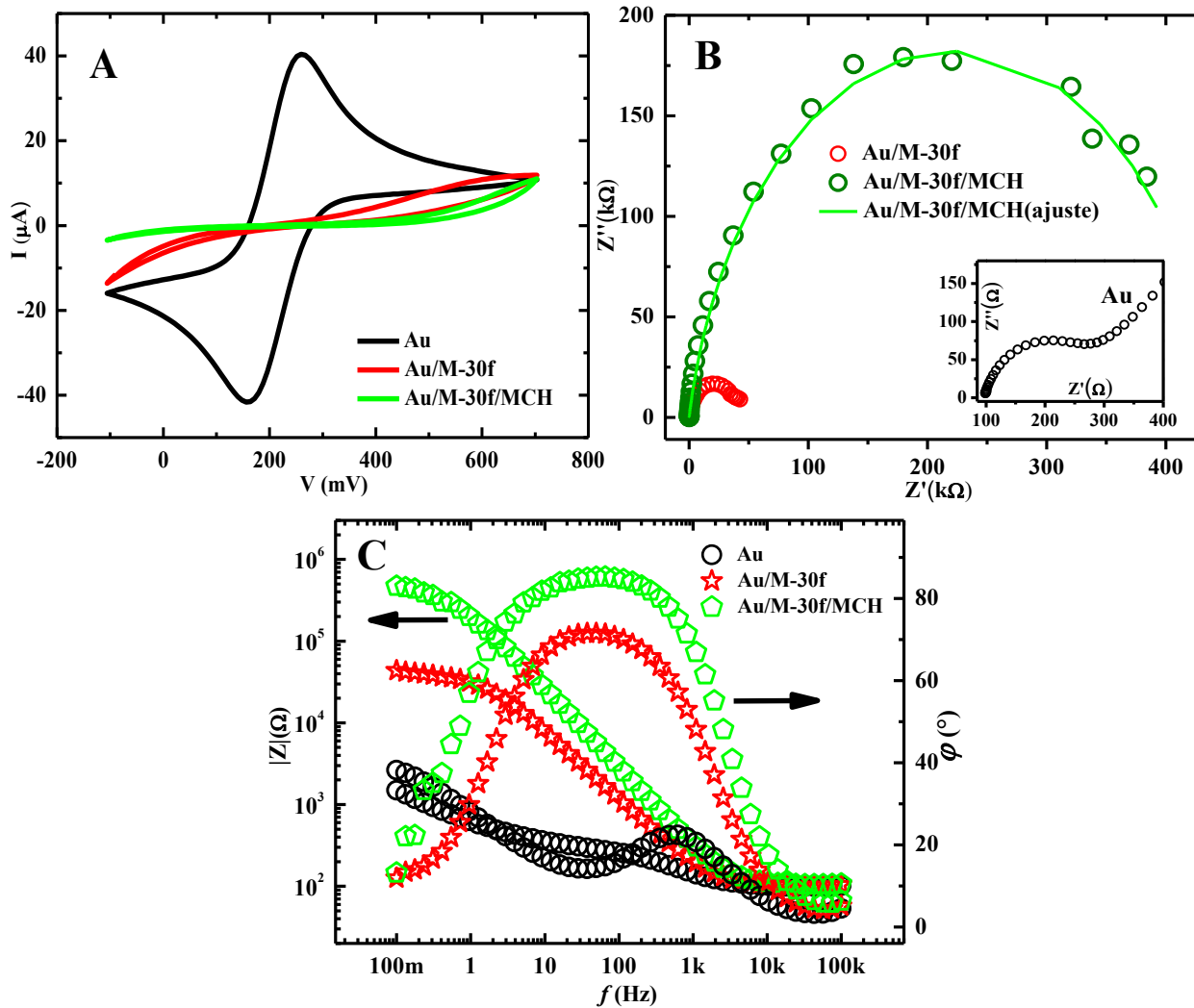
Continuando com o gráfico de Bode da Figura 4.8C, pode-se observar a fase  $\varphi$  no eixo  $y$  do lado direito em função da  $f$  no eixo  $x$ . As curvas do gráfico têm um comportamento de sela e atingem um máximo da fase na  $f_{pico}$ . Para o eletrodo de Au, a  $f_{pico}$  foi de 625Hz para uma fase  $\varphi$  de  $22^\circ$ , agora para o Au/M-30f, a  $f_{pico}$  foi de 316Hz e a fase de  $65^\circ$ , ou seja, teve um grande aumento na fase de  $43^\circ$ , porém uma diminuição da  $f_{pico}$ . Finalmente, os valores para o Au/M-30f/MCH, foram de 178Hz e  $71^\circ$ . Conclui-se que nessas duas últimas etapas do aptasensor, devido a se tornarem mais resistivas, a  $f_{pico}$  diminui e a  $\varphi$  aumenta com relação aos valores do eletrodo de Au.

A aderência do MCH no aptasensor impedimétrico, quando a imobilização do M-30f foi por drop-casting também foi estudada. Na Figura 4.9A são ilustradas as VCs para as, até agora, três etapas do aptasensor, e se observa uma queda drástica da corrente Faradaica nos voltamogramas da imobilização do M-30f e ainda uma queda maior quando acontece a aderência do MCH, em relação à VC do eletrodo de Au. Essa queda na corrente é produto de uma menor transferência de elétrons do ferri/ferro para o eletrodo, que se tornou mais resistivo (maior impedância), como consequência da ligação do M-30f primeiro e posteriormente do MCH no eletrodo.

Diagramas de Nyquist para três etapas do biossensor eletroquímico são mostrados na Figura 4.9B. Pode-se observar um aumento  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$  quase 10 vezes maior da  $R_{tc}$  quando acontece a aderência do MCH, quando comparado com a curva do M-30f imobilizado por drop-casting, tal incremento é um sinal do que o eletrodo tornou-se mais resistivo, produto da aderência do anti-incrustante MCH. Esse aumento resulta ser também maior que o a proporção  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$  do MCH quando a imobilização do M-30f foi por SAMs (Ver Figura 4.8B) que foi duas vezes maior, como descrito anteriormente. O ajuste do espectro de impedância de Au/M-30f/MCH com o CEE de Randles é mostrado em linha verde contínua. Um pequeno fato deve ser ressaltado, a curva do Au (da ordem de  $\Omega$ ) é muito

menor em relação às outras (da ordem de  $k\Omega$ ), conseqüentemente é mostrada inserida na Figura para poder ser apreciada. Valores das  $R_{tc}$ ,  $\Delta R_{tc}$  e  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$  para as curvas de impedância são detalhados na Tabela 4.3.

Figura 4.9 Voltametrias cíclicas B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode, para três etapas do aptasensor, a limpeza do eletrodo de Au, a imobilização por drop-casting do M-30f e a aderência do anti-incrustante MCH.



O diagrama de Bode é mostrado na Figura 4.9C, onde se apresenta as curvas de  $|Z|$  no eixo  $y$  da esquerda e  $\phi$  no eixo  $y$  da direita, versus  $f$  em forma explícita. No gráfico, pode-se observar que a frequências altas entre 100k-10kHz (lembrando que no potenciostato as medidas acontecem de frequências altas para baixas) quase nenhuma diferença é observada nos valores de  $|Z|$  entre as três etapas do aptasensor, pois é nesse intervalo de frequências que se manifesta a resistência da solução eletrolítica ( $R_s$ ), fato que é difícil apreciar no diagrama de Nyquist da Figura 4.9B, pois acontece no início da medida, ou seja, no lado esquerdo do

semicírculo e se manifesta com um leve deslocamento para o lado direito. Uma diferença entre as partes capacitivas das curvas passa a ser evidenciada entre as frequências 1kHz até 1Hz. Em seguida, entre as frequências de 1-100mHz, as curvas dos módulos  $|Z|$  de Au/M-30f e Au/M-30f/MCH, tornam-se quase constantes, sinal de que estamos observando as  $R_{tc(M-30f)}$  e  $R_{tc(MCH)}$ , respectivamente. Nesse último intervalo de frequências, os módulos  $|Z|$  das curvas do Au/M-30f por drop-casting (da ordem de  $10^4\Omega$ ), e módulos ainda maiores para o Au/M-30f/MCH (da ordem de  $10^5\Omega$ ), confirmam os diagramas de Nyquist da Figura 4.9B, que pode ser observado no final dos semicírculos.

Na outra parte do diagrama de Bode da Figura 4.9C, mostra-se uma diferença considerável na fase  $\varphi$  da  $f_{pico}$ , sendo de  $72^\circ$  em 50Hz para o Au/M-30f e de  $85^\circ$  em 66Hz para o Au/M-30f/MCH, esse incremento de  $13^\circ$  na fase das curvas, deve-se ao aumento das  $R_{tc(M-30f)}$  e  $R_{tc(MCH)}$ , respectivamente, que foi observada também na Figura 4.9B. Uma vantagem a ser ressaltada no diagrama de Bode, é o fato de poder apreciar as curvas do eletrodo de Au junto com as curvas das outras etapas do sensor, tanto para  $|Z|$  como para  $\varphi$ ; o que não é possível visualizar num diagrama de Nyquist, por isso a necessidade do gráfico inserido na Figura 4.9B como mencionado anteriormente.

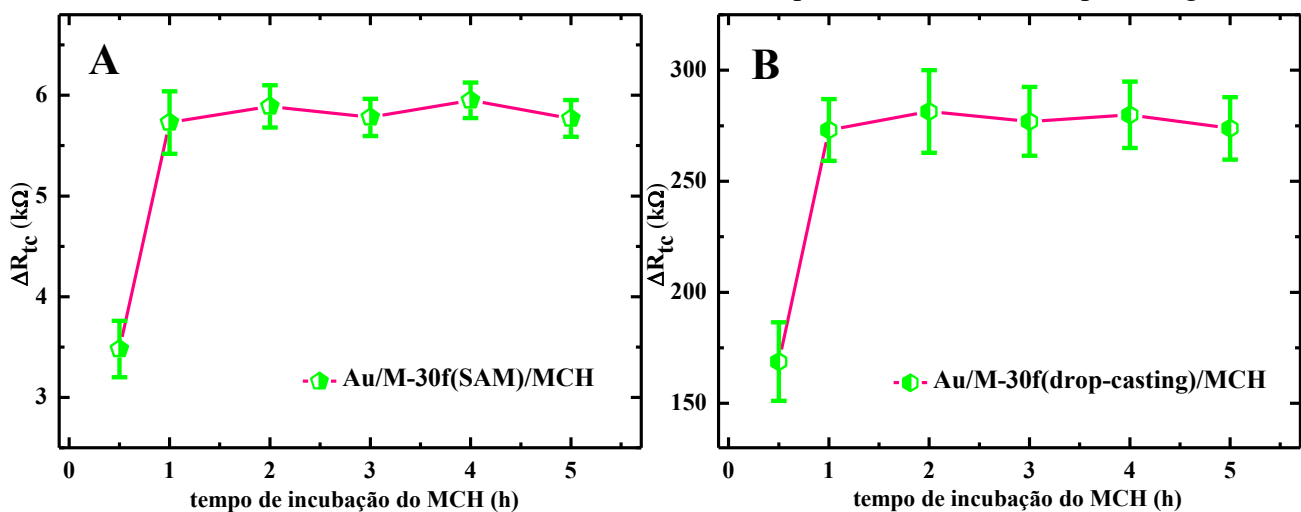
A Tabela 4.3, apresenta os valores da  $R_{tc(M-30f)}$ , no caso das duas imobilizações, por SAMs e drop-casting, bem como as  $R_{tc(MCH)}$  para quando adere o MCH no eletrodo, e seus incrementos  $\Delta R_{tc} = R_{tc(MCH)} - R_{tc(M-30f)}$ . Em todos os casos, as  $R_{tc}$  foram calculadas a partir de um ajuste das curvas de Nyquist com o CEE de Randles, mostrado anteriormente na Figura 2.26B, da secção 2.6.1.3. Conclui-se dos dados que valores das  $R_{tc}$  para a imobilização por SAMs são muito menores que os valores das  $R_{tc}$  para a imobilização por drop-casting, fato que foi antes advertido nos diagramas de Nyquist e de Bode. Outra particularidade, observada e mencionada anteriormente, foi as grandes incertezas da imobilização por drop-casting do M-30f, produto da irregularidade dos filmes formados por esse tipo de deposição. Finalmente, as proporções  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$ , foram de quase o dobro para a imobilização por SAMs e aproximadamente de 10 vezes para a imobilização por drop-casting. Confirmando que a imobilização por drop-casting do M-30f, por causa da alta densidade da solução que não permite um bom espalhamento na superfície e que resulta em filmes irregulares depois da evaporação do solvente, cobre menos a superfície do eletrodo e precisa mais do MCH para preencher os espaços vazios deixados pelo M-30f no eletrodo de Au.

Tabela 4.3 Os valores da aderência do MCH nas imobilizações por SAMs e drop-casting do M-30f, utilizando  $\Delta R_{tc} = R_{tc(MCH)} - R_{tc(M-30f)}$ ,  $R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$  e o CEE de Randles.

Imobilização do M-30f	$R_{tc(M-30f)}(k\Omega)$	$R_{tc(MCH)}(k\Omega)$	$\Delta R_{tc}(k\Omega)$	$R_{tc(MCH)}/R_{tc(M-30f)}$
SAM	$6,7\pm 0,3$	$13,1\pm 0,5$	$6,4\pm 0,6$	$1,96\pm 0,12$
Drop-casting	$49\pm 6$	$470\pm 8$	$421\pm 10$	$9,6\pm 1,2$

A etapa da aderência do MCH no biossensor impedimétrico precisa ser otimizada. Para esse propósito, testou-se diferentes tempos de incubação dos eletrodos Au/M-30f em uma solução de MCH de 1mM, tanto na imobilização do M-30f por SAMs, mostrado na Figura 4.10A (Dispositivo A) ou por drop-casting, mostrado na Figura 4.10B (Dispositivo B). Em ambas as Figuras é possível observar um rápido incremento  $\Delta R_{tc}$  na primeira 1/2h de  $3,5k\Omega$  e  $169k\Omega$  nos dispositivos A e B, respectivamente; salientando que os  $\Delta R_{tc}$  nos dispositivos onde o M-30f foi imobilizado por drop-casting são muito maiores que nos dispositivos por SAMs, como se pode conferir nas Figuras 4.10B e 4.10A, de forma respectiva. Após 1h, os incrementos  $\Delta R_{tc}$  atingem valores de  $5,7k\Omega$  e  $273k\Omega$  nos dispositivos A e B, nessa ordem. Seguidamente, identifica-se entre 1-5h, leves aumentos adicionais de entre  $0,04 - 0,22k\Omega$  e  $4 - 8k\Omega$  para os dispositivos A e B, de modo respectivo, o que indica que a saturação da aderência do MCH foi alcançada nos eletrodos. Dessa forma, 1h foi o tempo utilizado para a aderência do MCH no resto dos dispositivos. Outros aptasensores relataram na literatura o mesmo tempo de incubação para o MCH [62, 71].

Figura 4.10 Otimização do tempo de incubação para a aderência do anti-incrustante MCH nos eletrodos contendo o M-30f imobilizado por A. SAMs e B. Drop-casting.



#### 4.4 Detecção da STX

Após ter imobilizado no eletrodo de trabalho o M-30f seja por SAMs ou drop-casting, e, preenchido os espaços vazios deixados pelo M-30f com a aderência do anti-incrustante MCH, o aptasensor impedimétrico está pronto para detectar a STX, cuja ligação aconteceu só nos sítios onde o M-30f foi imobilizado, mas não onde foi aderido o MCH, por ser inerte à STX.

Primeiro serão apresentados os resultados da ligação da STX no aptasensor onde o M-30f foi imobilizado por SAMs. A Figura 4.11A mostra os voltamogramas cíclicos das quatro etapas do biossensor eletroquímico. Com relação à VC do Au limpo, a imobilização do M-30f por SAMs, apresenta um incremento entre os picos redox, bem como a aderência do MCH que tem um aumento ainda maior entre os picos. Por último, observa-se um pequeno decréscimo entre esses picos com respeito ao MCH, produto da ligação de  $0,3 \mu\text{g/L}$  da STX.

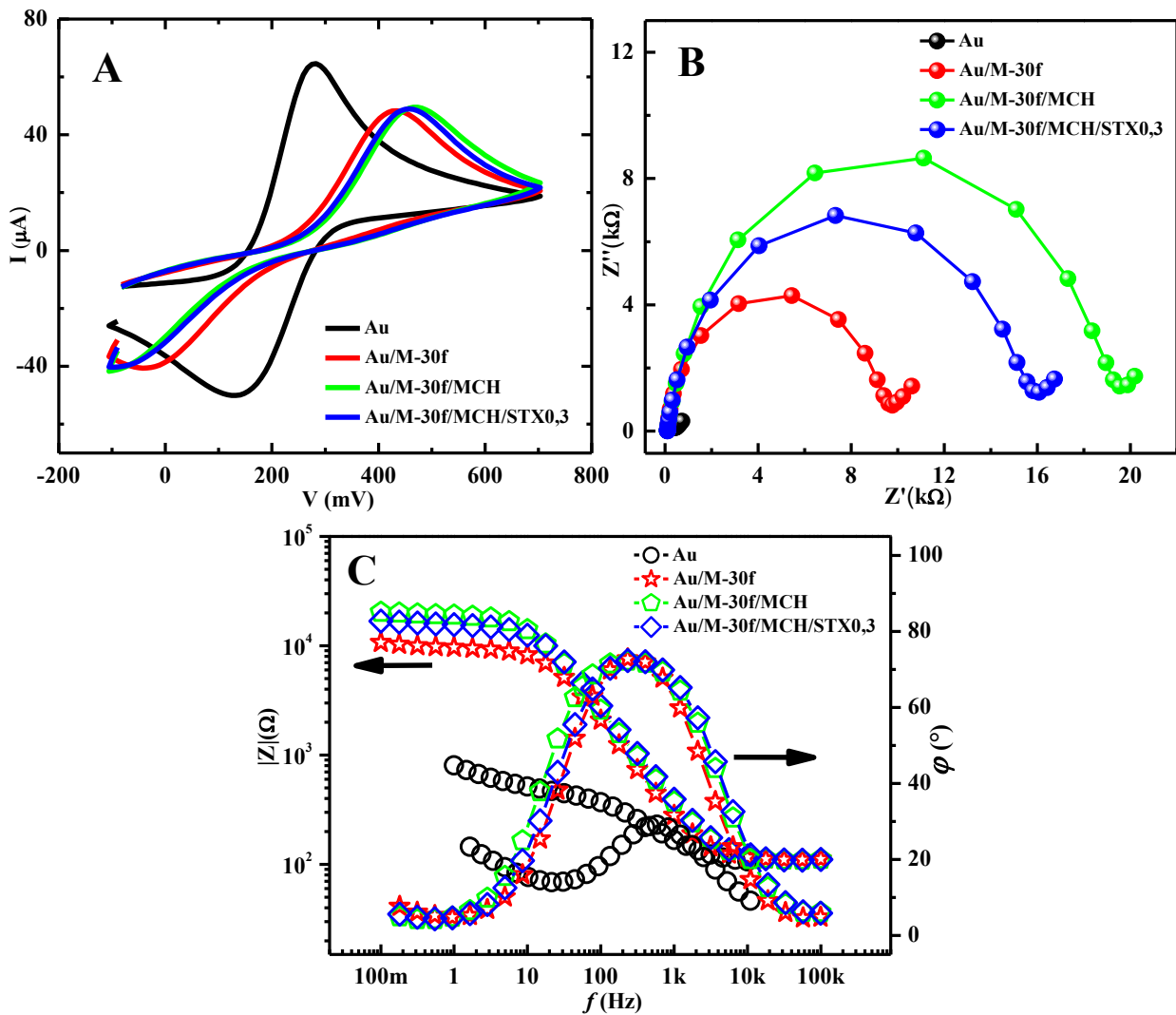
Da Figura 4.11A, também se observa a redução da corrente Faradaica nos picos catódicos (pico inferior), distinguindo-se com relação ao eletrodo de Au limpo, uma queda da corrente para a imobilização do M-30f por SAMs, uma redução adicional para a corrente quando aderiu o MCH e um pequeno aumento na corrente com relação ao MCH, quando acontece a ligação da STX. Esse incremento quase imperceptível na corrente Faradaica, quando liga a STX, significa um pequeno aumento na transferência de elétrons do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  com o eletrodo, um sinal de que a superfície do Au tornou-se menos resistiva (menor impedância). Essa pequena diminuição na impedância do aptasensor, quando ligou a STX, pode ser visualizada no diagrama de Nyquist da Figura 4.11B, onde observa-se que a curva que pertence à ligação da STX, tem um pequeno decréscimo  $\Delta R_{tc}$  com relação à impedância da aderência do MCH. Acredita-se que essa diminuição na  $R_{tc}$  está relacionada com uma mudança na carga total do aptasensor, produto da ligação da STX, que se traduz em uma alteração da força eletrostática entre a carga total do aptasensor e a espécie eletroativa, como explicam Bahadır&Sezgintürk [30].

Diagramas de Bode também são apresentados na Figura 4.11C. Observa-se que entre as frequências de 100-300mHz acontece um leve declínio, que representa a parte difusiva, mostradas nos rabos dos semicírculos do diagrama de Nyquist da Figura 4.11B. A seguir, distingue-se no gráfico que nas frequências entre 300m-10Hz, o módulo  $|Z|$  da STX é um pouco menor que o  $|Z|$  do MCH, ou seja, menos resistivo, porém, tem um  $|Z|$  maior que o M-30f, coincidindo com o diagrama de Nyquist da Figura 4.11B. Não é observada quase diferença entre as curvas das três últimas etapas do aptasensor entre as frequências de 20-



10kHz, região que representa a parte capacitiva das curvas. Finalmente, no intervalo de 10k-100kHz, todas as curvas atingem um mínimo de  $100\Omega$ , comportamento esperado por causa que representam a  $R_s$  do eletrólito; grandeza difícil de observar em um diagrama de Nyquist, pois se manifesta com um leve deslocamento da curva para o lado direito.

Figura 4.11 Caracterização eletroquímica das quatro etapas do aptasensor: O Au limpo, a imobilização por SAMs do M-30f, a aderência do MCH e ligação de  $0,3\mu\text{g/L}$  da STX. A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode.



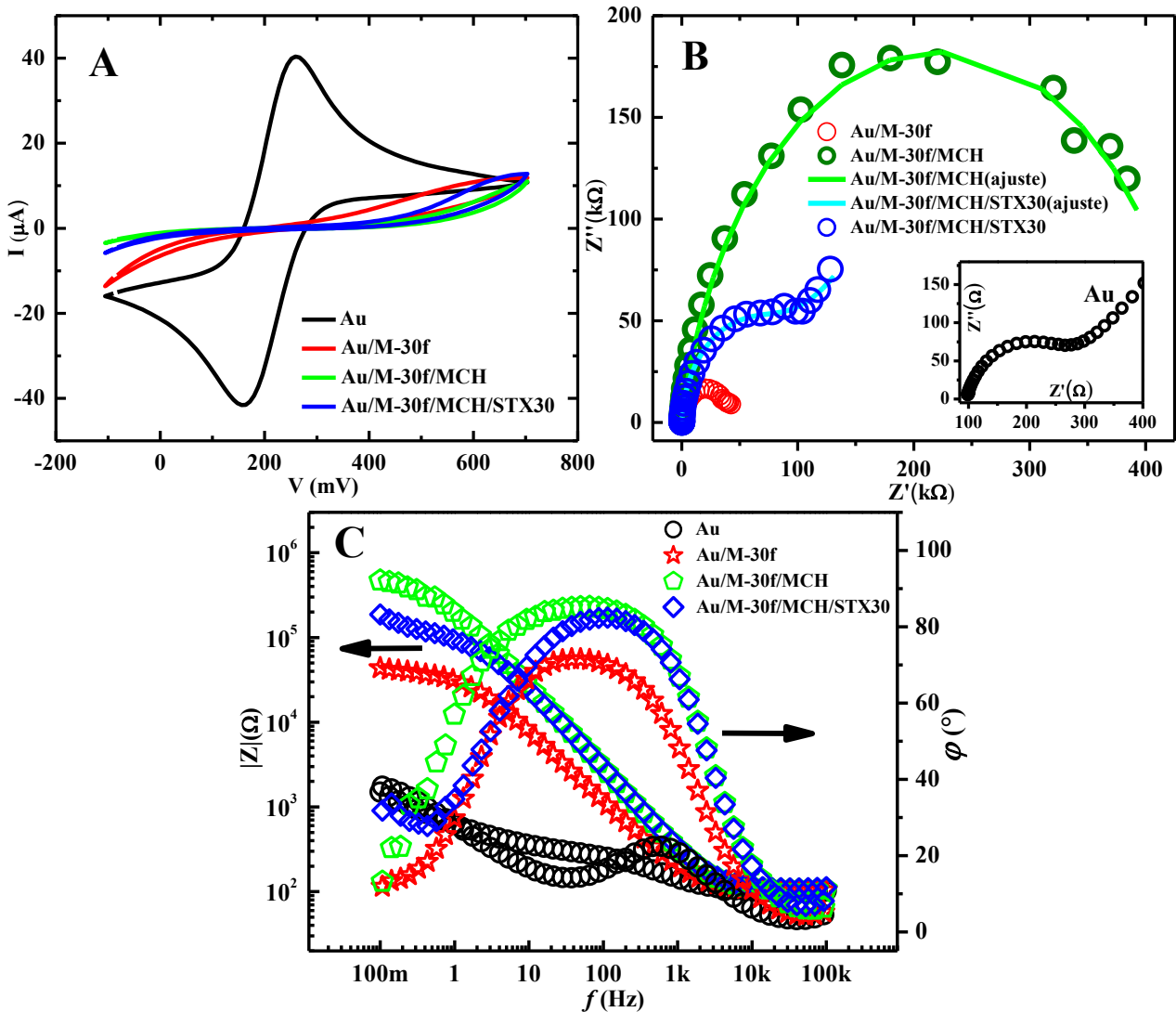
Por outro lado, no diagrama de Bode da Figura 4.11C, pode-se observar a fase  $\phi$  evoluindo com a frequência para cada uma das etapas do biossensor eletroquímico, onde infelizmente se vê pouca diferença entre os  $\phi$  das curvas do M-30f, o MCH e a STX. Nesse diagrama de Bode, identifica-se só um leve deslocamento para o lado direito da curva da STX com relação à curva do MCH, entre as frequências 1-100Hz. Tal deslocamento evidencia a

ligação dos  $0,3 \mu\text{g}/\text{L}$  da STX no aptasensor impedimétrico e deve-se a uma menor impedância vista também na Figura 4.11B. Deve-se salientar a falta de dados no diagrama de Bode para as frequências menores (100m-1Hz) e maiores (10k-100kHz) para o eletrodo de Au, porém, pode-se ver que têm um comportamento similar às outras curvas do mesmo gráfico; e curvas de Bode da limpeza do Au já foram apresentadas para todo o espectro de frequências em figuras anteriores (Ver Figuras 4.8C e 4.9C).

Em segundo lugar, apresentam-se os resultados da ligação da STX numa concentração de  $30 \mu\text{g}/\text{L}$  no aptasensor impedimétrico, onde o M-30f foi imobilizado por drop-casting. A Figura 4.12A mostra as VCs para as quatro etapas do biossensor, onde se observa (mais uma vez), uma queda drástica na corrente Faradaica para as últimas três etapas do aptasensor, porém, adverte-se um pequeno incremento nessa corrente Faradaica no pico anódico (pico da direita) depois da ligação dos  $30 \mu\text{g}/\text{L}$  da STX, quando comparada com a curva do MCH. Esse aumento na corrente Faradaica após a ligação da STX é produto de uma maior transferência de elétrons entre o biossensor e o eletrólito, traduzindo-se em uma menor resistência (impedância) no aptasensor impedimétrico, que se pode apreciar melhor no diagrama de Nyquist da Figura 4.12B, onde a imagem reflete um decremento na  $R_{tc(STX)}$  com relação à  $R_{tc(MCH)}$ . Acredita-se que essa diminuição na  $R_{tc(STX)}$  é produto de uma mudança na força eletrostática entre as cargas livres da STX e as espécies eletroativas da solução eletrolítica [30]. Deve-se mencionar que as linhas contínuas de Au/M-30f/MCH e Au/M-30f/MCH/STX30 são os ajustes dos espectros de impedância com o CEE de Randles para o MCH e a STX, respectivamente.

No diagrama de Bode da Figura 4.12C, pode-se observar a diferença entre as fases  $\varphi$  para as  $f_{pico}$  em cada etapa do aptasensor. Na curva do M-30f, a fase foi de  $72^\circ$  para uma  $f_{pico}$  de  $50\text{Hz}$ ; para o MCH, identifica-se um aumento na fase que chega a  $85^\circ$  para uma  $f_{pico}$  de  $66\text{Hz}$ , e para a STX, uma diminuição na fase que alcança os  $82^\circ$  para uma  $f_{pico}$  de  $115\text{Hz}$  é observada. Conclui-se então, que esse mesmo padrão de aumento e decremento da  $R_{tc}$  no diagrama de Nyquist da Figura 4.12B, para as curvas do MCH e da STX, respectivamente, é confirmado no diagrama de Bode para as fases  $\varphi$  nas  $f_{pico}$ .

Figura 4.12 Caracterização eletroquímica das quatro etapas do aptasensor: O Au limpo, a imobilização por drop-casting do M-30f, a aderência do MCH e a ligação da STX. A. Voltamogramas cíclicos B. Curvas de Nyquist e C. Diagramas de Bode.



Dessa vez, para compreender a relação entre as curvas de Nyquist e o diagrama de Bode, faz-se necessário explicar como acontecem as medidas no potenciostato, então se deve lembrar que no equipamento as medidas são feitas das frequências maiores às menores (100kHz-100mHz), ou seja, de direita para esquerda no eixo  $x$  da frequência no diagrama de Bode (Figura 4.12C). Acontece ao contrário em um diagrama de Nyquist (Figura 4.12B), ou seja, da esquerda para a direita (início até o final do semicírculo). Explicada a relação entre os gráficos, nas frequências maiores entre 100k-10kHz, ou seja, lado direito no diagrama de Bode e lado esquerdo (início do semicírculo) no diagrama de Nyquist, as curvas dos módulos  $|Z|$  para as quatro etapas do aptasensor estão quase sobrepostas e representam a  $R_s$  do eletrólito, fato que não é possível observar no diagrama de Nyquist, dado que se manifesta com um leve deslocamento inicial das curvas para o lado direito. A região de frequências

entre 10k-1Hz, representa a parte capacitiva das curvas, onde não se aprecia quase diferença entre as curvas do MCH e a detecção de STX, esse resultado era esperado, pois o biossensor desenhado não é capacitivo, senão Faradaico, ou seja, a solução eletrolítica é utilizada para medir mudanças da corrente na interface (eletrodo/eletrólito) que se manifestam em mudanças na impedância. A detecção da STX torna-se evidente na região de frequências pequenas, entre 1-100mHz, onde se manifesta a  $R_{tc}$  das curvas, contidas em  $|Z|$ , observa-se o mesmo decréscimo da impedância de STX com relação à curva do MCH, visto no diagrama de Nyquist, onde é muito mais visível no final dos semicírculos das curvas da Figura 4.12B. Finalmente, entre as frequências de 300m-100mHz, observa-se a parte difusiva de forma evidente só para a curva da STX, a  $Z_w$  manifesta-se com uma leve inclinação da curva. Essa mesma característica é observada no lado direito (final do semicírculo) do diagrama de Nyquist e são representados por partes retas em forma de rabo. No caso específico da Figura 4.12B, a difusão acontece também só para a curva da STX e menos evidente para o M-30f, mas não se produz no caso da aderência do MCH. Essa falta da parte difusiva, pode-se explicar pela imobilização do M-30f por drop-casting e da aderência do MCH sobre o eletrodo de Au, já que a produção de filmes não uniformes e espessos, podem interferir na transferência de carga através da interface eletrodo/eletrólito, produzindo um sistema eletroquímico cineticamente lento, com uma  $R_{tc}$  significativamente grande e alguns pontos levemente dispersos nos espectros de impedância, acredita-se que se precisaria de frequências ainda menores para mostrar a difusão da solução eletrolítica nessas etapas do aptasensor impedimétrico [110, 117].

A porcentagem de reprodução de um dispositivo é fundamental. No presente trabalho, o biossensor era reprodutível até a etapa da aderência do MCH, seja na imobilização do M-30f por SAMs ou drop-casting, porém, a reprodutibilidade do dispositivo na hora de detectar diferentes concentrações de STX era baixa. Então como estratégia para concluir o trabalho, decidiu-se focar na imobilização do M-30f por drop-casting. A escolha levou em consideração que as curvas da imobilização por drop-casting foram maiores do que por SAMs. Apesar de serem piores comportadas, ainda assim, a visualização dos resultados por drop-casting foi melhor para a análise. Outra característica da imobilização por drop-casting é a rápida construção do aptasensor, sendo que o resultado de qualquer teste é obtido no mesmo dia (12h), embora seja um trabalho bastante pesado. Os resultados dos testes da imobilização por SAMs podem ser conhecidos de um dia para outro (24h). Então a partir deste momento da

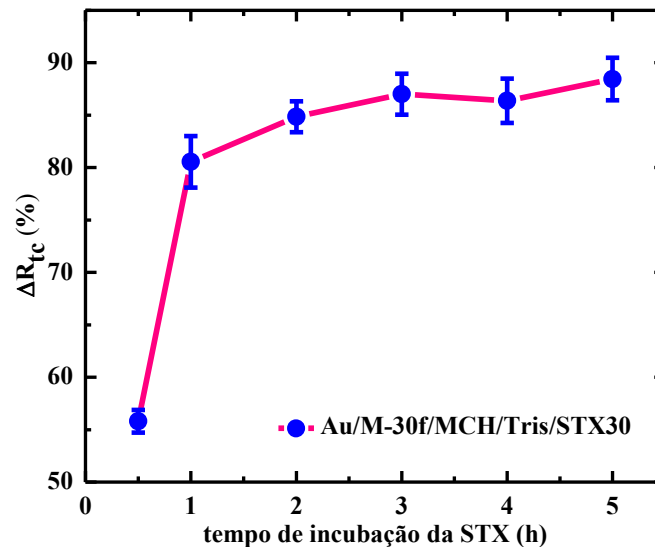
tese, todos os resultados e aprimoramentos do dispositivo, referem-se somente à imobilização do M-30f por drop-casting.

Com o objetivo de aumentar a porcentagem de reprodutibilidade do dispositivo para a detecção de diferentes concentrações de STX, implementou-se três mudanças principais no aptasensor: a primeira foi fazer as medidas de EIE em um potencial de circuito aberto (OCP, do Inglês Open Circuit Potential), no qual as correntes externas do sistema são minimizadas, permitindo diminuir as incertezas nas medidas. A segunda mudança foi cobrir a parte traseira e dianteira do eletrodo com uma máscara de fita isolante, deixando exposta apenas a área de trabalho, como mostra a Figura 3.2. Esclarecendo que no início da pesquisa a parte traseira do eletrodo por ser de vidro não era coberto com a fita isolante. Acredita-se que a diferença de constantes dielétricas entre a fita e o vidro produzia interferência na hora da detecção, dado que a detecção de STX para concentrações altas foi só possível depois dessa mudança. A terceira e última mudança era saber quanto e como interagia com aptasensor impedimétrico o tampão Tris no qual a STX era armazenada, até esse momento não se havia testado tal interação. A partir deste ponto até o final, todos os testes e aprimoramentos no dispositivo foram feitos com essas três mudanças, porém essas mudanças foram feitas uma por vez nos dispositivos, pois dessa forma saberíamos quais funcionavam e em qual proporção aprimoravam o dispositivo.

Como foi feito para as etapas do M-30f e MCH, o tempo mínimo necessário de incubação do eletrodo em uma solução de STX para a sua ligação e saturação dos sítios do M-30f no aptasensor é indispensável. Sabe-se que a concentração crítica da STX na água é de  $3 \mu\text{g}/\text{L}$  [11], conseqüentemente, decidiu-se utilizar uma concentração dez vezes maior para determinar esse tempo mínimo de incubação. Sabendo que para concentrações menores da STX, pode-se utilizar esse mesmo tempo, uma vez que uma menor concentração de STX necessita ocupar menos sítios do M-30f e precisaria de um tempo menor. As respostas do aptasensor em diferentes tempos de incubação para a solução de  $30 \mu\text{g}/\text{L}$  da STX, apresentam-se na Figura 4.13, onde é possível observar os decrementos do aptasensor impedimétrico  $\Delta R_{tc} = 1 - R_{tc(\text{menor})}/R_{tc(\text{maior})}$ , que representam a diminuição percentual da  $R_{tc}$ , utilizada para avaliar a detecção da STX antes da ligação, ou seja, para o MCH,  $R_{tc(\text{maior})}$ , e após a ligação da STX, ou seja,  $R_{tc(\text{menor})}$ . A resposta do aptasensor para STX aumentou rapidamente nos primeiros 30 minutos, chegando a 55%. Após 1h, cerca de 80% é obtido, seguido por um leve aumento de 10% de 1h para 5h, o que ilustra a saturação dos

sítios do M-30f no eletrodo por parte da STX no aptasensor impedimétrico. Assim, 1h foi usado como o tempo ótimo de ligação da STX nos experimentos seguintes. Outros aptasensores impedimétricos para ficotoxinas, relatados na literatura, usaram o mesmo tempo de incubação [52, 56, 57].

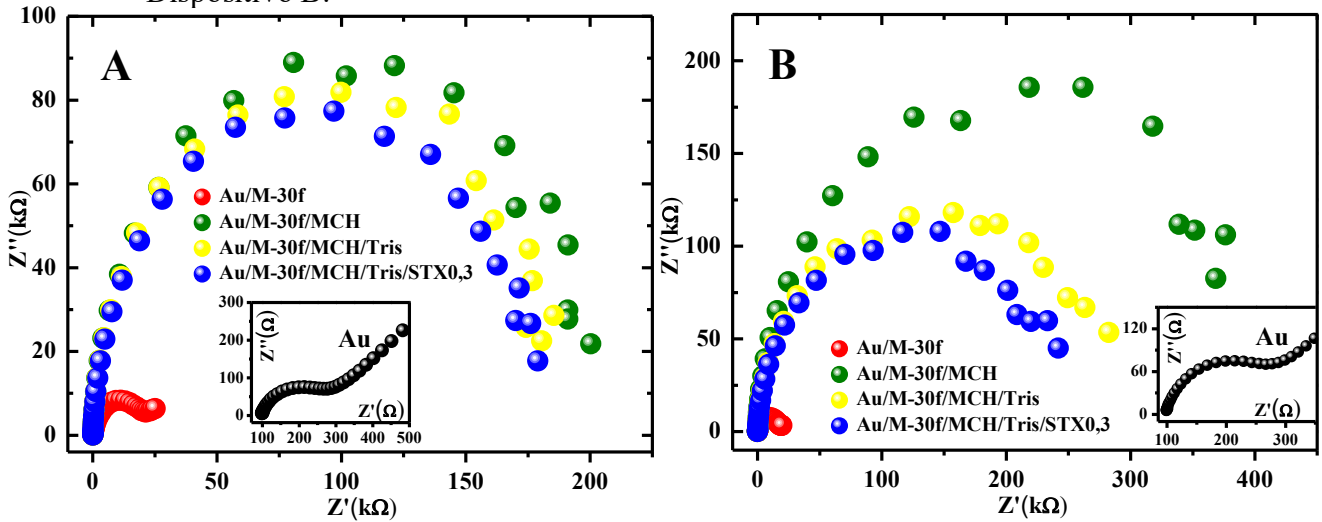
Figura 4.13 As respostas do aptasensor impedimétrico em diferentes tempos de incubação para a solução de  $30 \mu\text{g/L}$  de STX.



A interação do tampão Tris, no qual a STX é armazenada (ver a secção 3.4) com o aptasensor impedimétrico Au/M-30f/MCH deve ser analisada. Para tal propósito a Figura 4.14 apresenta dois dispositivos A e B, onde se identificam as curvas de Nyquist para as quatro etapas do biossensor, e adicionalmente é possível identificar as curvas de impedância do tampão Tris para observar a interação com o MCH. Além disso, mostra-se também a detecção de  $0,3 \mu\text{g/L}$  de STX. A diminuição percentual da  $R_{tc}$  é calculada por  $\Delta R_{tc} = 1 - R_{tc(menor)}/R_{tc(maior)}$ , onde  $R_{tc(maior)}$  seria a  $R_{tc(MCH)}$  ou  $R_{tc(Tris)}$ , e a  $R_{tc(menor)}$  poderia ser a  $R_{tc(STX)}$  ou  $R_{tc(Tris)}$ .

Por um lado, o dispositivo da Figura 4.14A, demonstra uma pequena diminuição  $\Delta R_{tc}$  de 7,43% quando o tampão Tris interage com o aptasensor Au/M-30f/MCH. Essa interação ou pequeno decremento do tampão da toxina é observado em outros aptasensores impedimétricos [52, 56, 57, 71]. Também foi identificado um decremento adicional  $\Delta R_{tc}$  de 3,47% da STX com respeito ao Tris, esse último  $\Delta R_{tc}$  foi utilizado para medir a detecção da STX nesse caso e nos seguintes dispositivo para as diferentes concentrações. Finalmente, foi observada uma diminuição  $\Delta R_{tc}$  de 10,65% da STX com relação ao MCH. Detalhes dos valores dos decrementos são apresentados na Tabela 4.4.

Figura 4.14 Os diagramas de Nyquist mostrando a interação do tampão Tris da STX com o aptasensor Au/M-30f/MCH e posterior detecção de STX A. Dispositivo A e B. Dispositivo B.



Por outro lado, o dispositivo da Figura 4.14B, diferentemente do dispositivo A, demonstra uma enorme queda na  $R_{tc}$  quando o Tris foi testado, que se traduz em um grande decremento  $\Delta R_{tc}$  de 28,56% do tampão Tris com relação ao MCH. Acredita-se que tal decremento indica um defeito no dispositivo B, provocando uma resposta errada para a STX que se reflete em um  $\Delta R_{tc}$  de 34,37% com relação ao MCH. Esse defeito pode ser apreciado só quando a solução do tampão Tris foi testada com o aptasensor Au/M-30f/MCH. Adicionalmente, identifica-se um pequeno decremento  $\Delta R_{tc}$  de 8,13% da STX com respeito ao Tris, esse decremento resulta ser próximo ao mostrado no dispositivo A para as mesmas duas curvas, podendo inclusive ser considerada como detecção da STX. Conclui-se então que a queda da impedância inicial deve-se à interação do Tris com o biossensor impedimétrico Au/M-30f/MCH e não à detecção da STX; por esse motivo, dispositivos com esse mesmo defeito foram descartados. O resumo dos valores dos decrementos é apresentado na Tabela 4.4.

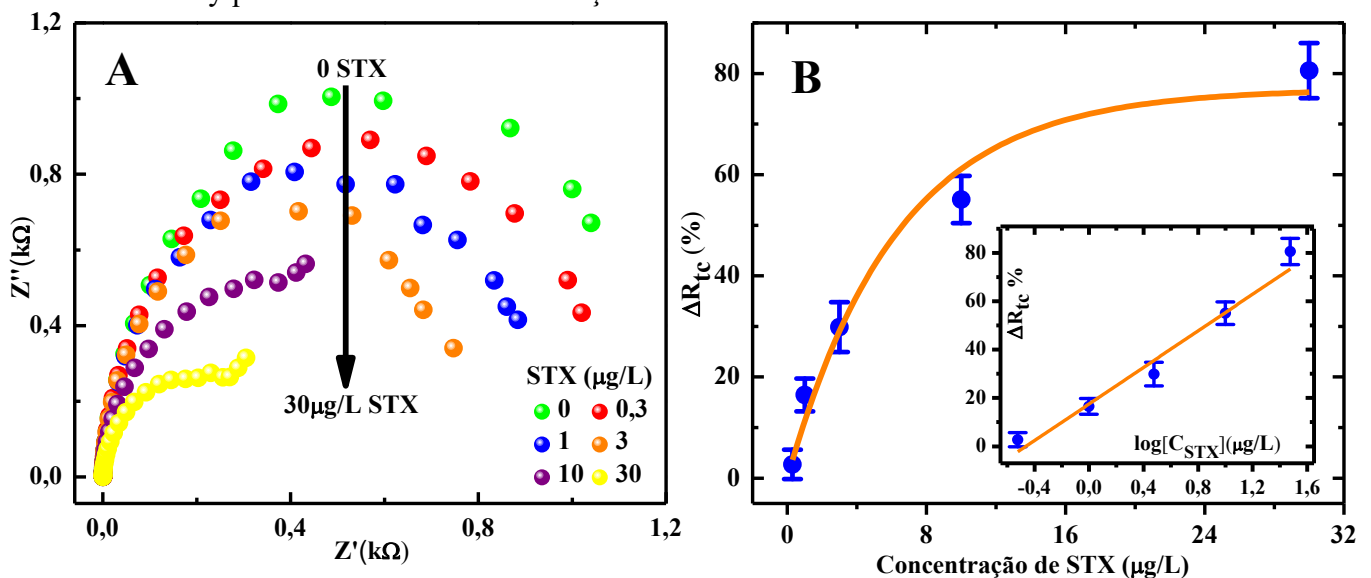
Tabela 4.4 Os valores das  $R_{tc}$  e dos decrementos  $\Delta R_{tc} = 1 - R_{tc(menor)}/R_{tc(maior)}$  para o MCH, tampão Tris e STX.

$R_{tc}$ e $\Delta R_{tc}$	Dispositivo A	Dispositivo B
$R_{tc(MCH)}(k\Omega)$	$200,30 \pm 8,20$	$368,60 \pm 8,90$
$R_{tc(Tris)}(k\Omega)$	$185,41 \pm 7,40$	$263,32 \pm 7,30$
$R_{tc(STX)}(k\Omega)$	$178,97 \pm 6,10$	$241,92 \pm 6,50$

$1 - R_{tc(Tris)}/R_{tc(MCH)}$	$7,43\% \pm 0,05\%$	$28,56\% \pm 0,03\%$
$1 - R_{tc(STX)}/R_{tc(Tris)}$	$3,47\% \pm 0,05\%$	$8,13\% \pm 0,04\%$
$1 - R_{tc(STX)}/R_{tc(MCH)}$	$10,65\% \pm 0,05\%$	$34,37\% \pm 0,02\%$

A resposta do biossensor impedimétrico para diferentes concentrações de STX na faixa entre 0,3 e 30  $\mu\text{g/L}$  é apresentada nos diagramas de Nyquist da Figura 4.15A. Após a incubação do aptasensor com a STX, foi observado um decréscimo na  $R_{tc}$  proporcional ao aumento da concentração da STX, acredita-se que esse decréscimo surge da mudança da força eletrostática entre as cargas livres da STX e as espécies eletroativas na solução eletrolítica [30]. É importante mencionar que uma mudança de conformação no aptâmero M-30f imobilizado, por causa do reconhecimento de STX é descartada, devido que pesquisas demonstram que o M-30f não sofre uma mudança conformacional na hora da ligação de STX [93]. Deve-se salientar que a imobilização do M-30f por drop-casting sobre o eletrodo de ouro produziu filmes não uniformes e espessos, que geram uma  $R_{tc}$  significativamente grande, podendo interferir na transferência de carga através da interface eletrodo/eletrólito, e produzir um sistema eletroquímico cineticamente lento e alguns pontos levemente dispersos no espectro de impedância [110, 117]. No entanto, os resultados deste trabalho são bastante reprodutíveis.

Figura 4.15 A resposta do biossensor impedimétrico para diferentes concentrações de STX na faixa entre 0,3 e 30  $\mu\text{g/L}$  em A. Os diagramas de Nyquist e B. A curva de calibração.



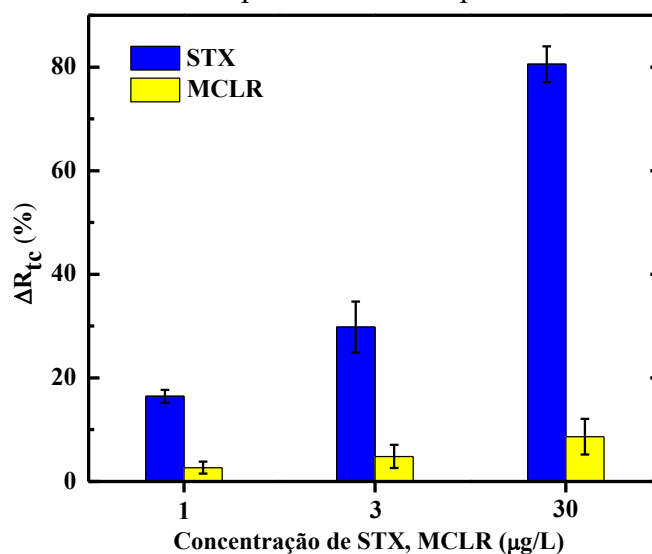


A taxa de diminuição da impedância  $\Delta R_{tc} = 1 - R_{tc(menor)}/R_{tc(maior)}$ , foi calculada para o aptasensor impedimétrico Faradaico Au/M-30f/MCH/Tris, antes da ligação da STX,  $R_{tc(maior)} = R_{tc(Tris)}$  e após a detecção da STX,  $R_{tc(menor)} = R_{tc(STX)}$ . A Figura 4.15B, mostra a curva de calibração após a incubação de diferentes concentrações da STX, identificando-se que um decremento  $\Delta R_{tc}$  de 30% corresponde à concentração limite de  $3 \mu\text{g/L}$  na água potável. Os pontos na curva de calibração representam a média de duas medições independentes. Inserido, uma equação de regressão linear  $\Delta R_{tc} = 0,38 \log(C_{STX}) + 0,18$ , com um coeficiente de correlação de 0,995, obtido quando a concentração da STX é expressa como logaritmo. O limite de detecção (LOD, do Inglês limit of detection) de  $0,3 \mu\text{g/L}$  foi estimado a partir da equação  $3S/m$  [52, 56, 57, 73], onde  $S$  é o desvio padrão da medição de impedância e  $m$  é a inclinação da reta de calibração inserida no gráfico.

#### 4.5 Especificidade na detecção: MCLR

A especificidade do aptasensor impedimétrico sem marcadores proposto, foi analisada através de experimentos de controle negativo, incubando o eletrodo Au/M-30f/MCH/Tris em uma solução de microcistina-LR (MCLR), que também é uma cianotoxina, mas não específica para o elemento de reconhecimento M-30f usado no presente trabalho. A Figura 4.16 mostra os decréscimos  $\Delta R_{tc}$  correspondentes às concentrações de 1, 3 e  $30 \mu\text{g/L}$  para ambas as toxinas, indicando que não há alteração significativa na  $R_{tc}$  na presença de MCLR em relação ao caso da STX, evidenciando a alta seletividade do dispositivo.

Figura 4.16 Análise da especificidade do aptasensor entre a STX e MCLR.



## 5 CONCLUSÃO

As conclusões serão listadas na ordem da construção do aptasensor impedimétrico sem marcadores desenvolvido nesse trabalho:

Identificou-se que a combinação de uma limpeza mecânica utilizando  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , com uma limpeza química de  $\text{KOH}+\text{H}_2\text{O}_2$  e uma varredura eletroquímica de  $\text{KOH}$  sobre o eletrodo de  $\text{Au}$ , apresentou um  $\Delta V = 96\text{mV}$  entre os picos redox e uma  $R_{tc} = 136\Omega$ , esses parâmetros foram o adequados para decidir que essa combinação de limpeza era apta para desenvolver o biossensor eletroquímico sobre o eletrodo de trabalho.

Foram imobilizadas no eletrodo de trabalho, duas sequências de APT,  $\text{APT}^{\text{STX}}$  e M-30f, com três funcionalizações com tiol,  $\text{APT1}^{\text{STX}}$ ,  $\text{APT2}^{\text{STX}}$  e M-30f, utilizando duas técnicas, as SAMs e drop-casting, após os testes, decidiu-se continuar trabalhando só com o M-30f. Aprimorou-se a imobilização do M-30f por SAMs no eletrodo de  $\text{Au}$ , concluindo que a concentração e o tempo ótimos de incubação para imobilizar o M-30f foram de  $1\mu\text{M}$  e de 8h, respectivamente. A otimização para a imobilização por drop-casting do M-30f também foi feita, os valores ideais para concentração, volume da solução e tempo de evaporação do solvente do M-30f, foram de  $1\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{L}$  e 1h, respectivamente. Foi observada nas curvas de VC uma queda da corrente Faradaica, muito maior na imobilização do M-30f por drop-casting que por SAMs. Identificou-se na imobilização do M-30f por drop-casting, curvas de impedância muito maiores que por SAMs, de até cinco vezes maior, tais impedâncias, apresentam uma incerteza de até  $\pm 2\text{k}\Omega$ , que torna difícil obter curvas similares. Essa irregularidade nas curvas de impedância da imobilização do M-30f por drop-casting, pode ser explicada por causa da espessura dos filmes, que inibem a transferência das espécies eletroativas da solução eletrolítica com o eletrodo, devido a uma enorme  $R_{tc}$  da ordem de  $10^4\Omega$ , e produzindo um sistema eletroquímico cineticamente lento e alguns pontos levemente dispersos no espectro de impedância.

O anti-incrustante MCH foi utilizado para preencher os espaços vazios na superfície do eletrodo de  $\text{Au}$  que o M-30f não conseguiu cobrir com as imobilizações por SAMs ou drop-casting. A caracterização eletroquímica por VC confirma uma queda da corrente Faradaica na hora da aderência do MCH, sendo muito mais drástica na imobilização por drop-casting quando comparada com a queda produzida pela imobilização por SAMs do M-30f. Medidas de EIE também foram feitas nessa etapa, observando-se nos dois tipos de imobilização, SAMs e drop-casting, um aumento na  $R_{tc}$  quando aderiu o MCH, sendo que a proporção do incremento da  $R_{tc}$  com relação ao M-30f, resultou ser dez e duas vezes maior

para a imobilização por drop-casting e SAMs, respectivamente. O aprimoramento da aderência do MCH nos eletrodos com as imobilizações do M-30f por SAMs e drop-casting foi feito, concluindo que o tempo de incubação suficiente para aderir o MCH nos eletrodos em ambos os casos foi de 1h.

Quando testada a detecção de STX nos aptasensores Au/M-30f/MCH, onde o M-30f foi imobilizado por SAMs ou drop-casting, observou-se diferentemente das etapas anteriores do aptasensor, um aumento na corrente Faradaica, que se refletiu em um decréscimo  $\Delta R_{tc}$ , tais características, foram vistas nos dois tipos de imobilizações, porém, foi mais evidente na imobilização por drop-casting. Por causa dessa última característica favorável, e à obtenção de resultados mais rápidos, decidiu-se focar na imobilização por drop-casting do M-30f para aumentar a reprodutibilidade dos dispositivos e detectar diferentes concentrações de STX. Três foram as estratégias para conseguir esse objetivo: na primeira, foram feitas as medidas de EIE em OCP, conseguindo diminuir as incertezas nas medidas. A segunda foi cobrir o anverso e reverso do eletrodo com a máscara de fita isolante, deixando exposta só a área de trabalho no anverso (no início o reverso do eletrodo por ser de vidro não era coberto), acredita-se que a diferença de constantes dielétricas entre a fita e o vidro produzia interferência na hora das medidas, dado que a detecção de STX para concentrações altas foi só possível depois dessa mudança. Por último, era necessário saber a interferência produzida pelo tampão Tris da STX com a detecção por parte do aptasensor. Sabe-se agora que alguns dispositivos apresentavam uma grande interação de impedância do tampão Tris com a detecção da STX, considerou-se que tais dispositivos tinham um defeito e foram descartados. O tempo mínimo que precisa a concentração de  $30 \mu\text{g}/\text{L}$  da STX para poder ligar completamente no aptasensor foi de 1h e utilizou-se esse tempo nos seguintes dispositivos.

Foi desenvolvido com sucesso um aptasensor impedimétrico, para detecção rápida de STX, na faixa de concentrações entre  $0,3$  e  $30 \mu\text{g}/\text{L}$ , usando o aptâmero M-30f como elemento de bioreconhecimento específico com alta afinidade, uma notável sensibilidade e estabilidade. Após a incubação do eletrodo Au/M-30f/MCH com a STX, foi observado um decréscimo na  $R_{tc}$  proporcional ao aumento da concentração da STX, acredita-se que esse decréscimo surge da mudança da força eletrostática entre as cargas livres da STX e as espécies eletroativas na solução eletrolítica. O limite de detecção obtido do aptasensor impedimétrico foi de  $0,3 \mu\text{g}/\text{L}$ , que corresponde a 10% da concentração limite da STX permitida na água potável ( $3 \mu\text{g}/\text{L}$ ) e identificou-se na curva de calibração para a detecção da STX, que um decremento  $\Delta R_{tc}$  de 30% corresponde a essa concentração limite. Além disso, o

aptasensor apresentou alta seletividade em experimentos de controle negativo, utilizando uma cianotoxina diferente, a MCLR, indicando que não há alteração significativa na  $R_{tc}$  na presença de MCLR em relação ao caso da STX, demonstrando ser uma alternativa promissora para detecção de STX em água. O método permitiu o monitoramento dos parâmetros eletroquímicos em cada etapa da modificação do eletrodo, devido à característica não invasiva da técnica de EIE, com o objetivo de discutir o princípio de funcionamento do dispositivo.

O aptasensor impedimétrico faradaico desenvolvido nesse trabalho, sugere como perspectivas futuras:

Como aplicação prospectiva, o aptasensor pode ser testado em amostras reais de água da Lagoa do Peri, utilizando como referência a curva de calibração realizada nesse trabalho.

Concluir o desenvolvimento do aptasensor impedimétrico por SAMs do M-30f iniciado nesse trabalho, os resultados prévios mostrados nessa tese, sugerem que as curvas por SAMs apresentam o mesmo padrão de detecção da STX que foi visto nas curvas por drop-casting, e tem um melhor comportamento.

Desenvolver um aptasensor impedimétrico capacitivo (não faradaico), com eletrodos de Au interdigitados, a hipótese é que por ser o eletrodo do mesmo material, as etapas para a fabricação podem ser idênticas e mudanças na capacitância podem ser detectadas por impedância não Faradaica.

Fabricar um aptasensor ótico, baseado na Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR, do Inglês, Surface plasmon resonance), o princípio é que mudanças na superfície de Au do eletrodo, na hora da ligação da STX, podem ser detectadas por alterações no índice de refração por intermédio da SPR.

## 6 REFERÊNCIAS

- [1] Naresh V, Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* 2021; 21: 1109.
- [2] Ensafi AA. An introduction to sensors and biosensors. In: *Electrochemical Biosensors*. Elsevier, 2019, pp. 1–10.
- [3] Dincer C, Bruch R, Costa-Rama E, et al. Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. *Adv Mater* 2019; 1806739.
- [4] Khanna VK. Introduction to Nanosensors. In: *Nanosensors: Physical, Chemical, and Biological*. Boca Raton: CRC Press, 2012, pp. 37–41.
- [5] Zhao Y, Yavari K, Liu J. Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs. *TrAC Trends Anal Chem* 2022; 146: 116480.
- [6] Villalonga A, Sánchez A, Mayol B, et al. Electrochemical biosensors for food bioprocess monitoring. *Curr Opin Food Sci* 2022; 43: 18–26.
- [7] Villalonga A, Pérez-Calabuig AM, Villalonga R. Electrochemical biosensors based on nucleic acid aptamers. *Anal Bioanal Chem* 2020; 412: 55–72.
- [8] Brett CMA. Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Molecules* 2022; 27: 1497.
- [9] Jain U, Saxena K, Hooda V, et al. Emerging vistas on pesticides detection based on electrochemical biosensors – An update. *Food Chem* 2022; 371: 131126.
- [10] Zheng W, Liu X, Li Q, et al. A simple electrochemical aptasensor for saxitoxin detection. *RSC Adv* 2022; 12: 23801–23807.
- [11] Ramos TK, Costa LDF, Yunes JS, et al. Saxitoxins from the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* can contaminate marine mussels. *Harmful Algae* 2021; 103: 102004.
- [12] Zhao Y, Li L, Yan X, et al. Emerging roles of the aptasensors as superior bioaffinity sensors for monitoring shellfish toxins in marine food chain. *J Hazard Mater* 2022; 421: 126690.
- [13] Noureen B, Ullah N, Tian Y, et al. An electrochemical PAH-modified aptasensor for the label-free and highly-sensitive detection of saxitoxin. *Talanta* 2022; 240: 123185.
- [14] Ullah N, Noureen B, Tian Y, et al. Label-Free Detection of Saxitoxin with Field-Effect Device-Based Biosensor. *Nanomaterials* 2022; 12: 1505.
- [15] Park JA, Kwon N, Park E, et al. Electrochemical biosensor with aptamer/porous

- platinum nanoparticle on round-type micro-gap electrode for saxitoxin detection in fresh water. *Biosens Bioelectron* 2022; 210: 114300.
- [16] Vigneshvar S, Sudhakumari CC, Senthilkumaran B, et al. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. *Front Bioeng Biotechnol* 2016; 0: 11.
- [17] Bhalla N, Jolly P, Formisano N, et al. Introduction to biosensors. *Essays Biochem* 2016; 60: 1–8.
- [18] Heineman WR, Jensen WB, Leland C, Clark Jr. (1918–2005). *Biosens Bioelectron* 2006; 21: 1403–1404.
- [19] Singh S, Kumar V, Dhanjal DS, et al. Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis. In: *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications*. Springer, Singapore, 2020, pp. 317–335.
- [20] Cesewski E, Johnson BN. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosens Bioelectron* 2020; 159: 112214.
- [21] Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, et al. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials (Basel)* 2019; 12: 121.
- [22] Menon S, Mathew MR, Sam S, et al. Recent advances and challenges in electrochemical biosensors for emerging and re-emerging infectious diseases. *J Electroanal Chem* 2020; 878: 114596.
- [23] Yan S-R, Foroughi MM, Safaei M, et al. A review: Recent advances in ultrasensitive and highly specific recognition aptasensors with various detection strategies. *Int J Biol Macromol* 2020; 155: 184–207.
- [24] Mishra G, Barfidokht A, Tehrani F, et al. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. *Foods* 2018; 7: 141.
- [25] Mishra G, Sharma V, Mishra R. Electrochemical Aptasensors for Food and Environmental Safeguarding: A Review. *Biosensors* 2018; 8: 28.
- [26] Ding J, Qin W. Recent advances in potentiometric biosensors. *TrAC Trends Anal Chem* 2020; 124: 115803.
- [27] Dzyadevych S, Jaffrezic-Renault N. Conductometric biosensors. In: *Biological Identification*. Elsevier, 2014, pp. 153–193.
- [28] Bollella P, Gorton L. Enzyme based amperometric biosensors. *Curr Opin Electrochem* 2018; 10: 157–173.
- [29] Newman JD, Turner APF. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective.

- Biosens Bioelectron* 2005; 20: 2435–2453.
- [30] Bahadır EB, Sezgintürk MK. A review on impedimetric biosensors. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* 2016; 44: 248–262.
- [31] Malvano F, Pilloton R, Albanese D. Label-free impedimetric biosensors for the control of food safety – a review. *Int J Environ Anal Chem* 2020; 100: 468–491.
- [32] Leva-Bueno J, Peyman SA, Millner PA. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med Microbiol Immunol* 2020; 209: 343–362.
- [33] Neethirajan S, Ragavan V, Weng X, et al. Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives. *Biosensors* 2018; 8: 23.
- [34] Monteiro T, Almeida MG. Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Crit Rev Anal Chem* 2019; 49: 44–66.
- [35] Huang Y, Xu J, Liu J, et al. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* 2017; 17: 2375.
- [36] Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Reagentless and reusable electrochemical affinity biosensors for near real-time and/or continuous operation. Advances and prospects. *Curr Opin Electrochem* 2019; 16: 35–41.
- [37] Li Z, Mohamed MA, Vinu Mohan AM, et al. Application of Electrochemical Aptasensors toward Clinical Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring: Review. *Sensors* 2019; 19: 5435.
- [38] He L, Huang R, Xiao P, et al. Current signal amplification strategies in aptamer-based electrochemical biosensor: A review. *Chinese Chem Lett* 2021; 32: 1593–1602.
- [39] Khan R, Ben Aissa S, Sherazi T, et al. Development of an Impedimetric Aptasensor for Label Free Detection of Patulin in Apple Juice. *Molecules* 2019; 24: 1017.
- [40] Xu Y, Zhang W, Shi J, et al. Impedimetric aptasensor based on highly porous gold for sensitive detection of acetamiprid in fruits and vegetables. *Food Chem* 2020; 322: 126762.
- [41] Tertis M, Leva PI, Bogdan D, et al. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. *Biosens Bioelectron* 2019; 137: 123–132.
- [42] Razmi N, Baradaran B, Hejazi M, et al. Recent advances on aptamer-based biosensors to detection of platelet-derived growth factor. *Biosens Bioelectron* 2018; 113: 58–71.
- [43] Zhu J, Huang H, Dong S, et al. Progress in Aptamer-Mediated Drug Delivery Vehicles for Cancer Targeting and Its Implications in Addressing Chemotherapeutic Challenges.

- Theranostics* 2014; 4: 931–944.
- [44] Qi X, Yan X, Zhao Y, et al. Highly sensitive and specific detection of small molecules using advanced aptasensors based on split aptamers: A review. *TrAC Trends Anal Chem* 2020; 133: 116069.
- [45] Lyu C, Khan IM, Wang Z. Capture-SELEX for aptamer selection: A short review. *Talanta* 2021; 229: 122274.
- [46] Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16: 181–202.
- [47] Negahdary M. Aptamers in nanostructure-based electrochemical biosensors for cardiac biomarkers and cancer biomarkers: A review. *Biosens Bioelectron* 2020; 152: 112018.
- [48] Li L, Xu S, Yan H, et al. Nucleic Acid Aptamers for Molecular Diagnostics and Therapeutics: Advances and Perspectives. *Angew Chemie Int Ed* 2021; 60: 2221–2231.
- [49] Zhang Y, Lai B, Juhas M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* 2019; 24: 941.
- [50] Adachi, Nakamura. Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules* 2019; 24: 4229.
- [51] Torabi R, Ranjbar R, Halaji M, et al. Aptamers, the bivalent agents as probes and therapies for coronavirus infections: A systematic review. *Mol Cell Probes* 2020; 53: 101636.
- [52] Eissa S, Ng A, Siaj M, et al. Selection and Identification of DNA Aptamers against Okadaic Acid for Biosensing Application. *Anal Chem* 2013; 85: 11794–11801.
- [53] Cruz-Aguado JA, Penner G. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 10456–10461.
- [54] Ng A, Chinnappan R, Eissa S, et al. Selection, characterization, and biosensing application of high affinity congener-specific microcystin-targeting aptamers. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 10697–10703.
- [55] Gu K, Famulok M. In vitro selection of specific aptamers against microcystin-LR. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2004; 38: 369–73.
- [56] Elshafey R, Siaj M, Zourob M. DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a. *Biosens Bioelectron* 2015; 68: 295–302.
- [57] Elshafey R, Siaj M, Zourob M. In Vitro Selection, Characterization, and Biosensing Application of High-Affinity Cyindrospermopsin-Targeting Aptamers. *Anal Chem*



- 2014; 86: 9196–9203.
- [58] Handy SM, Yakes BJ, DeGrasse JA, et al. First report of the use of a saxitoxin-protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin. *Toxicon* 2013; 61: 30–37.
- [59] Zheng X, Hu B, Gao SX, et al. A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation. *Toxicon* 2015; 101: 41–47.
- [60] Li F, Yu Z, Han X, et al. Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review. *Anal Chim Acta* 2019; 1051: 1–23.
- [61] Vasilescu A, Marty J-L. Electrochemical aptasensors for the assessment of food quality and safety. *TrAC Trends Anal Chem* 2016; 79: 60–70.
- [62] Oberhaus F V., Frense D, Beckmann D. Immobilization Techniques for Aptamers on Gold Electrodes for the Electrochemical Detection of Proteins: A Review. *Biosensors* 2020; 10: 45.
- [63] Celik U, Lee HJ, Keel T, et al. Molecular Level Structural Characterization of Self-Assembled Monolayers of Functionalized Bidentate Aromatic Thiols. *J Phys Chem C* 2021; 125: 24162–24169.
- [64] Liu M, Khan A, Wang Z, et al. Aptasensors for pesticide detection. *Biosens Bioelectron* 2019; 130: 174–184.
- [65] Laroussi A, Kot M, Flege JI, et al. Self-assembled monolayers from symmetrical dithiols: Preparation, characterization and application for the assembly of electrochemically active films. *Appl Surf Sci* 2020; 513: 145827.
- [66] Baig N, Sajid M, Saleh TA. Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications. *TrAC Trends Anal Chem* 2019; 111: 47–61.
- [67] Kaliyaraj Selva Kumar A, Zhang Y, Li D, et al. A mini-review: How reliable is the drop casting technique? *Electrochem commun* 2020; 121: 106867.
- [68] Kajal P, Ghosh K, Powar S. Manufacturing Techniques of Perovskite Solar Cells. 2018, pp. 341–364.
- [69] Yang Z, Zhang S, Li L, et al. Research progress on large-area perovskite thin films and solar modules. *J Mater* 2017; 3: 231–244.
- [70] Eissa S, Siaj M, Zourob M. Aptamer-based competitive electrochemical biosensor for brevetoxin-2. *Biosens Bioelectron* 2015; 69: 148–154.
- [71] Xiong X, Shi X, Liu Y, et al. An aptamer-based electrochemical biosensor for simple

- and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Anal Methods* 2018; 10: 365–370.
- [72] Hou L, Jiang L, Song Y, et al. Amperometric aptasensor for saxitoxin using a gold electrode modified with carbon nanotubes on a self-assembled monolayer, and methylene blue as an electrochemical indicator probe. *Microchim Acta* 2016; 183: 1971–1980.
- [73] Lin Z, Huang H, Xu Y, et al. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. *Talanta* 2013; 103: 371–374.
- [74] Serrano PC, Nunes GE, Avila LB, et al. Electrochemical impedance biosensor for detection of saxitoxin in aqueous solution. *Anal Bioanal Chem* 2021; 413: 6393–6399.
- [75] Lin P-H, Li B-R. Antifouling strategies in advanced electrochemical sensors and biosensors. *Analyst* 2020; 145: 1110–1120.
- [76] Campuzano S, Pedrero M, Yáñez-Sedeño P, et al. Antifouling (Bio)materials for Electrochemical (Bio)sensing. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 423.
- [77] Xu X, Makaraviciute A, Kumar S, et al. Structural Changes of Mercaptohexanol Self-Assembled Monolayers on Gold and Their Influence on Impedimetric Aptamer Sensors. *Anal Chem* 2019; 91: 14697–14704.
- [78] Chorus I, Welker M. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. 2nd ed. Taylor & Francis, 2021. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1201/9781003081449.
- [79] O Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, <http://conama.mma.gov.br/atos-normativos-sistema> (accessed 8 March 2023).
- [80] Bertani P, Lu W. Cyanobacterial toxin biosensors for environmental monitoring and protection. *Med Nov Technol Devices* 2021; 10: 100059.
- [81] Miglione A, Napoletano M, Cinti S. Electrochemical Biosensors for Tracing Cyanotoxins in Food and Environmental Matrices. *Biosensors* 2021; 11: 315.
- [82] Vogiazzi V, de la Cruz A, Mishra S, et al. A Comprehensive Review: Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Cyanotoxins in Freshwater. *ACS Sensors* 2019; 4: 1151–1173.
- [83] Azevedo SMF., Carmichael WW, Jochimsen EM, et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology* 2002; 181–182: 441–446.
- [84] Zhang W, Dixon MB, Saint C, et al. Electrochemical Biosensing of Algal Toxins in

- Water: The Current State-of-the-Art. *ACS Sensors* 2018; 3: 1233–1245.
- [85] He X, Liu Y-L, Conklin A, et al. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. *Harmful Algae* 2016; 54: 174–193.
- [86] Bratakou S, Nikoleli G-P, Siontorou CG, et al. Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Saxitoxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Anti-STX Using Graphene Electrodes. *Electroanalysis* 2017; 29: 990–997.
- [87] Ye W, Liu T, Zhang W, et al. Marine Toxins Detection by Biosensors Based on Aptamers. *Toxins (Basel)* 2019; 12: 1.
- [88] Gao S, Zheng X, Wu J. A bilayer interferometry-based competitive biosensor for rapid and sensitive detection of saxitoxin. *Sensors Actuators B Chem* 2017; 246: 169–174.
- [89] O’Neill K, Musgrave IF, Humpage A. Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 48: 7–16.
- [90] Diehl F, Ramos PB, dos Santos JM, et al. Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2016; 22: 18.
- [91] Li L, Zhao Y, Yan X, et al. Development of a terminal-fixed aptamer and a label-free colorimetric aptasensor for highly sensitive detection of saxitoxin. *Sensors Actuators B Chem* 2021; 344: 130320.
- [92] Zhao Y, Li L, Ma R, et al. A competitive colorimetric aptasensor transduced by hybridization chain reaction-facilitated catalysis of AuNPs nanozyme for highly sensitive detection of saxitoxin. *Anal Chim Acta* 2021; 1173: 338710.
- [93] Cheng S, Zheng B, Yao D, et al. Study of the binding way between saxitoxin and its aptamer and a fluorescent aptasensor for detection of saxitoxin. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2018; 204: 180–187.
- [94] Ha S-J, Park J-H, Lee B, et al. Label-Free Direct Detection of Saxitoxin Based on a Localized Surface Plasmon Resonance Aptasensor. *Toxins (Basel)* 2019; 11: 274.
- [95] Cheng S, Zheng B, Yao D, et al. Determination of Saxitoxin by Aptamer-Based Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal Lett* 2019; 52: 902–918.
- [96] Caglayan MO, Üstündağ Z. Saxitoxin aptasensor based on attenuated internal reflection ellipsometry for seafood. *Toxicon* 2020; 187: 255–261.
- [97] Qi X, Yan X, Zhao L, et al. A facile label-free electrochemical aptasensor constructed

- with nanotetrahedron and aptamer-triplex for sensitive detection of small molecule: Saxitoxin. *J Electroanal Chem* 2020; 858: 113805.
- [98] Ullah N, Chen W, Noureen B, et al. An Electrochemical Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>Tx Aptasensor for Sensitive and Label-Free Detection of Marine Biological Toxins. *Sensors* 2021; 21: 4938.
- [99] Baptista M, Nixdorf B. Low disturbances favor steady state: case of cyanobacterial monodominance in a Brazilian coastal lagoon. *Inl Waters* 2014; 4: 243–254.
- [100] Wang S, Zhang J, Gharbi O, et al. Electrochemical impedance spectroscopy. *Nat Rev Methods Prim* 2021; 1: 41.
- [101] Gabrielli C. Once upon a time there was EIS. *Electrochim Acta* 2020; 331: 135324.
- [102] Kemp NT. A Tutorial on Electrochemical Impedance Spectroscopy and Nanogap Electrodes for Biosensing Applications. *IEEE Sens J* 2021; 21: 22232–22245.
- [103] Magar HS, Hassan RYA, Mulchandani A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors* 2021; 21: 6578.
- [104] Kretzschmar J, Harnisch F. Electrochemical impedance spectroscopy on biofilm electrodes – conclusive or euphonious? *Curr Opin Electrochem* 2021; 29: 100757.
- [105] Habekost A. Fundamentals and Applications of Electrochemical Impedance Spectroscopy - A Didactic Perspective. *World J Chem Educ* 2020; 9: 14–21.
- [106] Grossi M, Riccò B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. *J Sensors Sens Syst* 2017; 6: 303–325.
- [107] EIS Basic Background Theory – Pine Research Instrumentation Store, <https://pineresearch.com/shop/kb/theory/eis-theory/basic-background-theory/> (accessed 6 October 2022).
- [108] EIS Mathematical Theory – Pine Research Instrumentation Store, <https://pineresearch.com/shop/kb/theory/eis-theory/eis-mathematical-theory/> (accessed 6 October 2022).
- [109] Bertok T, Lorencova L, Chocholova E, et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Biosensors: Mechanistic Principles, Analytical Examples and Challenges towards Commercialization for Assays of Protein Cancer Biomarkers. *ChemElectroChem* 2019; 6: 989–1003.
- [110] Lasia A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. 1st ed. Springer New York, 2014. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1007/978-1-4614-8933-7.

- [111] Lasia A. The Origin of the Constant Phase Element. *J Phys Chem Lett* 2022; 13: 580–589.
- [112] Strong ME, Richards JR, Torres M, et al. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2021; 177: 112949.
- [113] Tkac J, Davis JJ. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. *J Electroanal Chem* 2008; 621: 117–120.
- [114] Heiskanen AR, Spégel CF, Kostesha N, et al. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Proliferation on Thiol-Modified Planar Gold Microelectrodes Using Impedance Spectroscopy. *Langmuir* 2008; 24: 9066–9073.
- [115] Fischer LM, Tenje M, Heiskanen AR, et al. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectron Eng* 2009; 86: 1282–1285.
- [116] Mercaptohexanol | C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS - PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mercaptohexanol> (accessed 7 October 2022).
- [117] Yuan X-Z, Song C, Wang H, et al. *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells*. London: Springer London, 2010. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1007/978-1-84882-846-9.