

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

AMANDA LOOS VARGAS ZINSER

**AuNPs ESTABILIZADAS EM SILSESQUIOXANO PARA A DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA DE miRNAs ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER**

PONTA GROSSA

2025

AMANDA LOOS VARGAS ZINSER

**AuNPs ESTABILIZADAS EM SILSESQUIOXANO PARA A DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA DE miRNAs ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa
Coorientadora: Profa. Dra. Karen Wohnrath
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique de Souza
Picciani.

PONTA GROSSA

2025

Z78 Zinser, Amanda Loos Vargas
AuNPs estabilizadas em silsesquioxano para a detecção eletroquímica de miRNAs associados à Doença de Alzheimer / Amanda Loos Vargas Zinser. Ponta Grossa, 2025.
86 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessôa.
Coorientadora: Profa. Dra. Karen Wohnrath.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique de Souza Picciani.

1. Doença de Alzheimer. 2. Biossensor eletroquímico. 3. miRNA-29a. 4. miRNA-34a. 5. Silsesquioxanos. I. Pessôa, Christiana Andrade. II. Wohnrath, Karen. III. Picciani, Paulo Henrique de Souza. IV. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. V.T.

CDD: 541.37

TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA LOOS VARGAS

“AuNPs ESTABILIZADAS EM SILSESQUIOXANO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE miRNAs ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **CHRISTIANA ANDRADE PESSOA**
Data: 16/07/2025 18:00:34-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Orientadora Prof.^a Dra. Christiana Andrade Pessoa
UEPG/PR

Documento assinado digitalmente
 **ANA GRACI BRITO MADURRO**
Data: 16/07/2025 13:44:21-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dra. Ana Graci Brito Madurro
UFU/MG

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINA WEIGERT GALVAO**
Data: 15/07/2025 09:56:29-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dra. Carolina Weignert Galvão
UEPG/PR

Ponta Grossa, 14 de julho de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por permitir os meios para a realização desse projeto, por me fortalecer quando eu acreditei não ter forças, por seu amor e abundância infinitos.

Aos meus pais Janine e José (*in memorian*) por me amarem incondicionalmente, por tudo o que fizeram por mim, por iluminarem o meu caminho para que eu pudesse caminhar ainda mais longe e por sempre acreditarem na minha capacidade.

À minha orientadora Prof^a Dra. Christiana Andrade Pessôa e à minha coorientadora Prof^a Dra. Karen Wohnrath pela orientação, por me acolherem de forma tão carinhosa e incentivarem a minha curiosidade científica, por todos os conselhos preciosos e pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique de Souza Picciani por todo o auxílio e conhecimentos compartilhados.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram comigo e me impulsionaram durante essa caminhada, especialmente ao meu esposo Bruno Barbisan Zinser pela paciência, por todo carinho e compreensão, por ser meu suporte em todos os momentos, desde a decisão de entrar no programa de mestrado até as etapas finais. À minha tia Helga Sant'Ana Loos e à minha amiga Francielle Lopes pelo incentivo e apoio incondicionais e por terem enxergado antes de mim o quanto eu poderia caminhar.

Aos meus colegas do GDEM por todas as experiências e ideias compartilhadas, pelas risadas e pelo apoio durante todos esses meses juntos. Ao PPGQ e aos professores do programa pelo conhecimento compartilhado.

À equipe do LABMOM por gentilmente realizar o preparo de amostras e por todo o auxílio prestado ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Aos laboratórios C-LABMU e IMA-UFRJ pela realização das análises necessárias.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica – INEO pelo apoio e o incentivo à pesquisa.

“Como seria a vida se não tivéssemos coragem de tentar coisa alguma?”

(Vincent Van Gogh)

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a maior causadora de demência em todo o mundo e até o momento a doença não possui cura, tornando-se crucial o diagnóstico precoce e rápido a fim de minimizar as perdas neurológicas e de qualidade de vida. Contudo, o diagnóstico precoce da DA ainda enfrenta muitos desafios, destacando-se as possíveis contribuições de uma detecção rápida a partir de biomarcadores não-invasivos. Nesse sentido, este trabalho teve como o objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a detecção dos miRNAs 29a e 34a, ambos potenciais biomarcadores não-invasivos associados a doenças como a DA. Na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) incorporou-se o nanohíbrido inédito AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, obtido a partir da síntese de AuNPs tendo como agente estabilizante o cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilaminopiridínio) silsesquioxano (Si4DMAP⁺Cl⁻). Este foi caracterizado pelas técnicas de FTIR, Uv-Vis, MEV, MET e DLS, o qual demonstrou boa estabilidade ($\zeta = +43,0$) com raio hidrodinâmico médio de 66,4 nm e tamanho médio de 6 nm obtido pela contagem de partículas. O nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ foi incorporado por *drop-coating* na superfície de dois ECVs e realizou-se a caracterização eletroquímica em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). Sobre as superfícies dos ECVs modificados foram imobilizadas as sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a, separadamente, seguidas da imobilização da molécula de BSA sobre a superfície dos mesmos para obtenção dos biossensores, designados como ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/sonda/BSA (onde sonda = anti-miRNA-34a ou anti-miRNA-29a). A imobilização dos anti-miRNAs foi constatada pela diminuição nos valores de *i*_p e pelo aumento significativo nos valores de *R*_{ct}, obtidos pelas técnicas de EIE e VOQ, ocasionados pela repulsão da sonda redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} na presença das biomoléculas. O nanohíbrido contribuiu significativamente para o incremento na resposta eletroquímica e para os processos de transferência de carga, demonstrando ser eficiente na imobilização de ambos os anti-miRNAs, além de demonstrar estabilidade da suspensão pelo período de 650 dias. Os biossensores obtidos foram empregados na detecção dos alvos miRNA-29a e miRNA-34a a partir da hibridização com as respectivas sondas anti-miRNAs, apresentando LOD = 1,79 pmol μL⁻¹ para o miRNA-29a e LOD = 2,21 pmol μL⁻¹ para o miRNA-34a. A partir dos resultados obtidos, considera-se que há potencialidade de aplicação da plataforma para a detecção eletroquímica destes e de outros miRNAs em amostras de sangue para o diagnóstico da DA e de outras doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, biossensor eletroquímico, miRNA-29a, miRNA-34a, silsesquioxanos, nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the leading cause of dementia worldwide and, thus far, has no cure. Thus, early and rapid diagnosis is crucial to minimize both neurological damage and loss of quality of life. However, early diagnosis of AD still faces many challenges, highlighting the potential contributions of fast detection through non-invasive biomarkers. In this context, the objective of this study was to develop an electrochemical biosensor for the detection of miRNAs 29a and 34a, both of which are potential non-invasive biomarkers associated with diseases such as AD. On the surface of a glassy carbon electrode (GCE) a novel nanohybrid AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ was incorporated, which was synthesized using gold nanoparticles (AuNPs) stabilized by the 3-n-propyl(4-dimethylaminopyridinium) silsesquioxane chloride (Si4DMAP⁺Cl⁻). The material was characterized using FTIR, UV-Vis, SEM, TEM, and DLS techniques, demonstrating good stability ($\zeta = +43.0$ mV), with an average hydrodynamic radius of 66.4 nm and an average particle size of 6 nm determined by particle counting. The nanohybrid was applied to the surface of two GCEs via drop-coating and electrochemical characterization was carried out in 0.1 mol L⁻¹ PBS buffer containing [Fe(CN)₆]^{3-/4-} using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), Cyclic Voltammetry (CV) and Square Wave Voltammetry (SWV). Anti-miRNA-29a and anti-miRNA-34a probes were immobilized separately on the modified GCE surfaces, followed by the immobilization of BSA molecules to finalize the biosensor architecture. These were designated as GCE/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/probe/BSA (where probe = anti-miRNA-34a or anti-miRNA-29a). The immobilization of the anti-miRNAs was confirmed by a decrease in peak current (*i_p*) values and a significant increase in charge transfer resistance (*R_{ct}*) values, as observed through EIS and SWV analyses. These changes were attributed to the repulsion of the redox probe [Fe(CN)₆]^{4-/3-} in the presence of the immobilized biomolecules. The nanohybrid significantly enhanced the electrochemical response and charge transfer processes, proving to be effective in immobilizing both anti-miRNAs. It also demonstrated suspension stability over a period of 650 days. The developed biosensors were used for the detection of target miRNA-29a and miRNA-34a through hybridization with their complementary anti-miRNA probes, showing limits of detection (LOD) of 1.79 pmol μ L⁻¹ for miRNA-29a and 2,21 pmol μ L⁻¹ for miRNA-34a. Based on the results obtained, the proposed platform shows strong potential for the electrochemical detection of these and other miRNAs in blood samples for the diagnosis of AD and other neurodegenerative diseases.

Keywords: Alzheimer's Disease, electrochemical biosensor, miRNA-29a, miRNA-34a, silsesquioxane, gold nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 1995 e 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “ <i>sensor or biosensor</i> ” contendo ou não o termo “ <i>electrochemical</i> ” no resumo	20
Figura 2 - Trabalhos publicados de 2007 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNAs <i>or</i> microRNAs <i>or</i> miRNAs <i>or</i> miRNA <i>or</i> miR”.	21
Figura 3 – Trabalhos publicados de 2008 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNA-29a <i>or</i> miRNA-29a <i>or</i> miR-29a” no resumo.	22
Figura 4 – Trabalhos publicados de 2008 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNA-34a <i>or</i> miRNA-34a <i>or</i> miR-34a” no resumo.	22
Figura 5 – Processo canônico de biogênese dos microRNAs.	26
Figura 6 - Representação esquemática dos principais componentes de um biossensor.	30
Figura 7 – Representação esquemática da imobilização de sondas de DNA empregando a técnica de quimiossorção para A) Nanopartículas de ouro e B) Nanocompósito com nanopartículas de ouro.....	32
Figura 8 – Circuito equivalente de Randles e diagrama de Nyquist para espectros de impedância eletroquímica.	35
Figura 9 – Diagramas de Nyquist para as diferentes etapas de construção de um biossensor para a detecção do miRNA-21 a partir de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nitreto de carbono e AuNPs.	36
Figura 10 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor <i>dual-mode</i> desenvolvido para a detecção do miRNA-145.	37
Figura 11 – Representação esquemática de um biossensor multiplex baseado em um eletrodo de trabalho triplo feito de carbono modificado com AuNPs/GO/GQDs utilizando antraquinona, azul de metileno e polidopamina como indicadores redox para detecção de miRNAs específicos.	38
Figura 12 – Representação estrutural dos silsesquioxanos.....	42
Figura 13 – Representação esquemática das etapas de preparação de um biossensor para detecção do ZIKV.....	43
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos ($v = 50\text{mV s}^{-1}$) obtidos para $65\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de NIF (pH 8,0) empregando quatro diferentes arquiteturas para o eletrodo: ECV branco; ECV/Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ ; ECV/CoTsPc-Nafion e ECV/CoTsPc-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	44

Figura 15 - Representação esquemática das etapas empregadas na construção do biossensor até a fase de hibridização do alvo miRNA-29a e miRNA-34a, sem a incorporação da molécula de BSA.	51
Figura 16 – (A) Estrutura do cloreto de 3-n-propil(4-dimetilaminopiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$) e (B) estrutura sugerida para o nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$	54
Figura 17 - Espectros de absorção na região do UV-Vis para as dispersões de $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e HAuCl_4 obtidas na faixa de 200 a 800 nm.	55
Figura 18 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para o material $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e o nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ obtidos em KBr.	56
Figura 19 – Imagens de MEV-FEG obtidas em diferentes aproximações para o $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ em (a) e (b) e para o nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ em (c) e (d).	58
Figura 20 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) obtidas para $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ para as diferentes aproximações a) 100 nm, b) 50 nm e c) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs obtidos a partir da imagem de MET com a contagem de 86 partículas.	59
Figura 21 - (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura 100 mV s^{-1}) e (B) voltamogramas de onda quadrada (faixa de -0,2 V a 1,0 V, amplitude 0,02 V e frequência de 25 Hz) para ECV, $\text{ECV/Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ obtidos em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$	61
Figura 22 - Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para ECV, $\text{ECV/Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na faixa de 20 kHz a 100 mHz.	63
Figura 23 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ a fim de monitorar a estabilidade do mesmo após a realização de 200 varreduras de potencial em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}).	64
Figura 24 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ monitorado no intervalo de 650 dias a partir da data de sua síntese (faixa de -0,2 V a 1,0 V, amplitude 0,02 V e frequência de 25 Hz).	65
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos do $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a}$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a/miRNA-29a}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos a velocidade de varredura 100 mV s^{-1}	67
Figura 26 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura 100 mV s^{-1}) e (B) voltamogramas de onda quadrada (faixa de -0,2 V a 1,0 V, amplitude 0,02 V e frequência de 25 Hz) para $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a}$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a/miRNA-29a}$ para $100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ de alvo em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$	68
Figura 27 – Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a}$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a/miRNA-29a}$	

29a/miRNA-29a em PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na faixa de 20 kHz a 100 mHz. 70

Figura 28 - Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para (A) ECV/AuNPs-Si₄DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a e (B) ECV/AuNPs-Si₄DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a/miRNA-34a em diferentes concentrações. PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na faixa de 20 kHz a 100 mHz. 74

Figura 29 - Curvas analíticas obtidas com base nos valores médios de ΔR_{ct} apresentados na tabela 15 para (A) ECV/AuNPs-Si₄DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/BSA e (B) ECV/AuNPs-Si₄DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a/BSA após a hibridização com as diferentes concentrações dos alvos..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos principais tipos de biossensores eletroquímicos, técnicas de análise e princípios.	33
Tabela 2 – Trabalhos reportados na literatura para a detecção eletroquímica de miRNAs associados a Doença de Alzheimer.	40
Tabela 3 – Sequências de miRNA empregadas nas etapas de construção do biossensor, sendo elas como sondas o anti-miRNA-29a e o anti-miRNA-34a e como alvos o miRNA-29a e o miRNA-34a, respectivamente.	47
Tabela 4 - Valores dos níveis empregados na otimização do biossensor para os biossensores ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miRNA-34a via planejamento fatorial 2 ³	51
Tabela 5 - Valores em número de onda para a região do infravermelho e os respectivos modos vibracionais das bandas observadas nos espectros do material Si4DMP ⁺ Cl ⁻ e do nanohíbrido AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ obtidos em KBr e comparados com os valores encontrados na literatura.	56
Tabela 6 – Valores de Potencial Zeta (ζ) e DLS referentes ao Si4DMP ⁺ Cl ⁻ e ao nanohíbrido AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻	57
Tabela 7 – Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 13a para os eletrodos ECV, ECV/Si4DMP ⁺ Cl ⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻	61
Tabela 8 – Valores de potencial e corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 13b para ECV, ECV/Si4DMP ⁺ Cl ⁻ , ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻	62
Tabela 9 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{ct}) e resistência da solução (R_s) obtidos pela técnica de EIE referentes aos diagramas de Nyquist da Figura 14 para os eletrodos ECV, ECV/Si4DMP ⁺ Cl ⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻	63
Tabela 10 – Valores de potencial e corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 24 para ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ do dia 1 ao dia 650.	65
Tabela 11 - Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 16a para os eletrodos 1- ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ , 2- ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miRNA-29a e 3- ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miRNA-29a/miRNA-29a.	68
Tabela 12 – Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 16b para ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ , ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a e ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a/miR-29a.	69
Tabela 13 – Valores de resistência de transferência de carga e resistência da solução obtidos a partir dos elementos utilizados no circuito equivalente pela técnica de EIE referentes aos diagramas de Nyquist da Figura 17 para os eletrodos 1) ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ ; 2) ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /Anti-miRNA-29a e 3) ECV/AuNPs-Si4DMP ⁺ Cl ⁻ /Anti-miRNA-29a/miRNA-29a.	70

Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 utilizado para a otimização das variáveis envolvidas na etapa de montagem do biossensor. As variáveis estudadas foram: [anti-miRNA-29a] = 5 (-), 10 (0) e 15 pmol μL^{-1} (+); [anti-miRNA-34a] = 1 (-), 5 (0) e 10 pmol μL^{-1} (+); e Tempo_{inc} para ambos = 25 (-), 50 (0) e 75 min (+)..... 71

Tabela 15 – Valores médios de ΔRct e respectivos valores de desvio padrão obtidos em duplicata para o ensaio de detecção dos miRNAs 29a e 34a por EIE em diferentes concentrações..... 74

Tabela 16 – Valores de ΔRct obtidos nos ensaios de detecção em soro diluído dos miRNAs 29a e 34a por EIE em diferentes concentrações..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β A – β -amiloide

β A42, β A42/ β A40 – Peptídeos beta-amiloide 40 e 42

ΔR_{ct} – Variação de resistência à transferência de carga

ADAM10 – Proteína Desintegrina e Metaloproteinase 10

AgNPs – Nanopartículas de prata

APOE-e4 – Alelo E4 do gene da apolipoproteína E

APP – Proteína precursora amilóide de sítio beta 1

AuNPs – Nanopartículas de ouro

AuNPs-Si₄DMAP⁺Cl⁻ – Nanopartículas de ouro estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilpiridínio) silsesquioxano

AuNWs – *Gold nanowires* (nanofios de ouro)

BACE1 – Enzima β -secretase

BSA – Albumina sérica bovina

CCL – Comprometimento Cognitivo Leve

C-LABMU-UEPG – Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG

CT – Tomografia Computadorizada

DA – Doença de Alzheimer

DGCR8 – *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*

DP – Doença de Parkinson

DNs – Doenças Neurodegenerativas

DLS – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento Dinâmico de Luz)

ECV – Eletrodo de carbono vítreo

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

E_p – Potencial de pico

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier)

GDEM – Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados

GO – Óxido de grafeno

GQDs – *Graphene Quantum dots* (Pontos quânticos de grafeno)

IMA-UFRJ – Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano - UFRJ

i_p – Corrente de pico

i_{pa} – Corrente de pico anódico

i_{pc} – Corrente de pico catódico

IP-MS – Imunoprecipitação associada à espectrometria de massa

LABMOM – Laboratório de Biologia Molecular Microbiana

LbL – *Layer-by-layer* (camada por camada)

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MCH – Mercaptohexanol

MET (TEM) – *Transmission Electron Microscopy* (Microscopia eletrônica de transmissão)

MEV-FEG (FEG-SEM) – *Field Emission Gun - Scanning Electron Microscopy* (Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo)

miRNAs – microRNAs

MNPS – Nanopartículas metálicas

mRNAs – RNAs mensageiros

NAV3 – *Neuron navigator 3* (neurônio navegador 3)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato

PET – Tomografia de Emissão de Pósitrons

PGE – *Pencil graphite electrode* (eletrodo de lápis de grafite)

PNA – Ácido nucleico peptídico

R_{ct} – Resistência à transferência de carga

RISC – *RNA-induced silencing complex* (complexo silenciador induzido por RNA)

RNA – Ácido ribonucleico

R_s – Resistência da solução

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa

SAM – *Self-assembled monolayer* (monocamada auto-organizada)

$Si_4DMAP^+Cl^-$ – Cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilpiridínio) silsesquioxano

$Si_4Pic^+Cl^-$ – Cloreto de 3-*n*-propil(4-metilpiridínio) silsesquioxano

$SiAMPy^+Cl^-$ – Cloreto de 3-*n*-propil(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano

SiMoA – *Single Molecule Array* (Matriz de molécula única)

$SiPy^+Cl^-$ – Cloreto de 3-*n*-propilpiridínio silsesquioxano

SIRT1 – Sirtuína 1

SLV – Voltametria de Varredura Linear

SPCE – Eletrodo de carbono impresso

SPR – *Surface Plasmon Resonance* (ressonância plasmônica de superfície)

ssDNA – *Single stranded* DNA (DNA de simples fita)

UV-Vis – Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

VC – Voltametria Cíclica

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

ZNA – Ácido nucleico ZIP

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	ESTADO DA ARTE	19
2.2	DOENÇA DE ALZHEIMER E DIAGNÓSTICOS	23
2.3	microRNAs E A DOENÇA DE ALZHEIMER	25
2.4	BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	29
2.4.1	Estratégias de imobilização de biomoléculas em biossensores eletroquímicos	31
2.4.2	Classificação dos biossensores eletroquímicos a partir do tipo de transdução eletroquímica	33
2.4.3	Biossensores eletroquímicos na detecção de microRNAs.....	36
2.4.4	Biossensores eletroquímicos a base de microRNAs na detecção da Doença de Alzheimer	39
2.5	SILSESQUIOXANOS EM SENSORES E BIOSSENSORES	41
3	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL.....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	47
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	48
4.3	METODOLOGIA.....	48
4.3.1	Síntese do $\text{Si}_4\text{DMP}^+\text{Cl}^-$	48
4.3.2	Síntese de AuNPs estabilizadas em $\text{Si}_4\text{DMP}^+\text{Cl}^-$	49
4.3.3	Caracterização dos silsesquioxano $\text{Si}_4\text{DMP}^+\text{Cl}^-$ e do nanohíbrido AuNPs- $\text{Si}_4\text{DMP}^+\text{Cl}^-$	49
4.3.4	Construção do biossensor de miRNA modificado com AuNPs- $\text{Si}_4\text{DMP}^+\text{Cl}^-$	50

4.3.5	Estudo de otimização do biossensor para o miRNA-29a modificado com AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	51
4.3.6	Curva analítica e análises em amostra real	52
4.3.7	Medidas eletroquímicas	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ E AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ ..	54
5.1.1	Caracterização eletroquímica dos materiais Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ e AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ na modificação do ECV	60
5.1.2	Caracterização eletroquímica do biossensor de miRNA modificado com AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	66
5.1.3	Otimização do biossensor para detecção de miRNAs modificado com AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das Doenças Neurodegenerativas (DNs) que mais atinge pessoas em todo o mundo, sendo a maior causadora de demência e a quinta maior causadora de mortes em países industrializados. A demência é caracterizada principalmente pelo enfraquecimento na capacidade de pensamento em pelo menos dois domínios e pela perda de memória (Long; Holtzman, 2019) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram cerca de 10 milhões novos casos de demência em todo o mundo, sendo até 70% destes casos de pacientes com DA (Gunes *et al.*, 2022). Com a perda progressiva de neurônios ocasionada pela deterioração das células neuronais, os indivíduos com DA apresentam sintomas iniciais como a perda de memória recente e alterações comportamentais, até os estágios mais avançados de progressão da doença onde o paciente fica incapacitado de realizar atividades cotidianas. Como a doença não possui cura até o momento, ainda que intensas pesquisas estejam sendo realizadas nessa busca, torna-se crucial o diagnóstico rápido e precoce da doença visando minimizar as perdas neurológicas e de qualidade de vida dos pacientes.

Os principais biomarcadores utilizados para detecção da DA atualmente são os acúmulos anormais de fragmentos de proteínas tau e β -amiloides (β A) no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes. Contudo, ainda existem dificuldades no diagnóstico da DA e na detecção dos seus biomarcadores, uma vez que são necessários diversos exames invasivos e dispendiosos, como os imunoenaios, a punção lombar para retirada de LCR e a Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET). Além disso, o diagnóstico da DA exige que os especialistas realizem o acompanhamento dos sintomas apresentados pelos pacientes para a exclusão de outras DNs. O principal problema é que, além de elevar o tempo de diagnóstico, a presença desses sintomas indica que o indivíduo apresenta declínio cognitivo e que, consequentemente, nesse ponto o cérebro já esteja sofrendo danos. Acredita-se que a DA começa a se desenvolver no organismo humano numa faixa de tempo de anos e até uma década antes da manifestação dos sintomas clínicos (Sperling *et al.*, 2011), isso evidencia a necessidade de buscar biomarcadores que contribuam para um diagnóstico precoce da doença, detectando-os de maneira rápida

Os microRNAs (miRNAs) têm recebido grande destaque como potenciais biomarcadores não-invasivos para a identificação precoce de diversas doenças, tais como cânceres e as DNs, por desempenharem um papel importante na regulação de genes codificadores de proteínas. Os miRNAs são pequenas sequências de RNA não codificante que

atuam na regulação da expressão gênica e estão relacionados com a maioria dos processos biológicos (Jorge *et al.*, 2021). A maior vantagem da utilização dos miRNAs como potenciais biomarcadores das DNs está na possibilidade de encontrá-los em fluidos biológicos circulantes tais como sangue e urina e, dessa maneira, tornar os diagnósticos mais precisos, rápidos e minimamente invasivos. Para aplicações clínicas, um biomarcador ideal deve estar disponível em amostras biológicas que sejam fáceis de obter por meio de uma técnica segura e de fácil manipulação.

O desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos para a detecção de biomarcadores associados às DNs e especialmente a DA é promissor em relação ao custo, tempo de resposta e sensibilidade da técnica. Na literatura são encontrados alguns trabalhos que visam a utilização de miRNAs presentes em fluidos circulantes como biomarcadores para a DA, como os trabalhos desenvolvidos por Miglione *et al.* (2022), no qual realizou-se a detecção do miRNA-29a com um dispositivo eletroquímico impresso modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) e por Pereira *et al.* (2023), no qual também foi desenvolvido um biossensor modificado com AuNPs eletrodepositadas para a detecção do miRNA-34a, entre outros trabalhos desenvolvidos para a detecção eletroquímica de miRNAs. A partir de técnicas como a Voltametria Cíclica (VC), a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), analisando as variações de correntes de pico (i_p) e resistência à transferência de carga (R_{ct}), é possível detectar eletroquimicamente sequências de miRNAs específicos para a doença.

Tendo em vista que a gama de miRNAs associados à DA é grande, optou-se por utilizar o miRNA-29a e o miRNA-34a em função das evidências que sugerem grande relação desses miRNAs com o desenvolvimento da doença. A principal importância atribuída à essas famílias de miRNAs provém da atuação na regulação da β -secretase (BACE1) (Hébert *et al.*, 2008; Kiko *et al.*, 2014; Samadian *et al.*, 2021) enzima que atua na produção dos peptídeos β A, um dos principais biomarcadores da DA. Assim, visando obter uma técnica menos invasiva, com maior sensibilidade e diminuição do tempo necessário para a detecção de biomarcadores circulantes, propõe-se nesse trabalho o desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico modificado com AuNPs estabilizadas em um material do tipo silsesquioxano capaz de detectar as sequências dos miRNAs -29a e -34a associados à DA, de modo a contribuir para um diagnóstico rápido, precoce e de baixo custo para a doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTADO DA ARTE

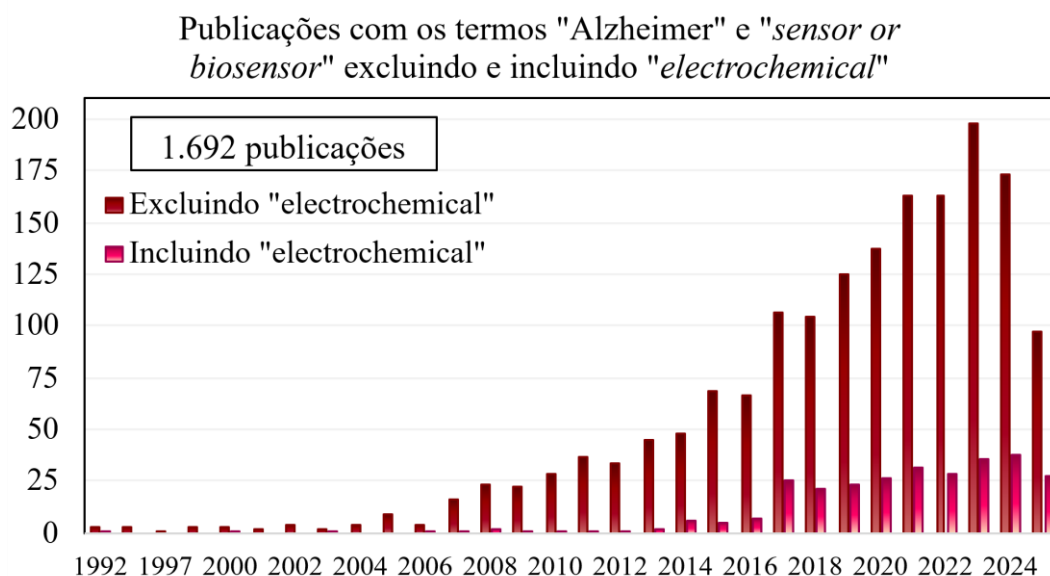
A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência em pessoas idosas em todo o mundo, ocasionando principalmente o enfraquecimento da capacidade mental e a perda de memória. Estima-se que com uma população que está tendo maior expectativa de vida o número de indivíduos com Alzheimer possa crescer ainda mais, uma vez que a incidência tende a aumentar conforme o aumento da idade (Rajan *et al.*, 2021) e, por esta razão, tem-se buscado evoluir o diagnóstico da DA, uma vez ela não tem cura e o tempo é crucial. Ainda que ela não tenha cura até os dias atuais, o diagnóstico precoce pode permitir intervenções, farmacológicas ou não, com o potencial de retardar a progressão dos sintomas e preservar tanto tempo quanto possível a autonomia dos pacientes. Entretanto, um dos maiores desafios na DA é o tempo de levado para o diagnóstico, uma vez que são necessários exames complexos e demorados, muitas vezes onerosos, além do acompanhamento dos sintomas clínicos (O'Bryant *et al.*, 2016). Com a descoberta de biomarcadores associados à doença, como os peptídeos β -amiloide, responsáveis pela formação das placas β -amilóide, e a proteína tau-hiperfosforilada, ocasionando a formação de emaranhados neurofibrilares (Kumar *et al.*, 2023), o desenvolvimento de sensores e biossensores aumentou significativamente nos últimos anos, especialmente motivado pela busca formas menos invasivas e mais acessíveis de diagnóstico.

Ao realizar uma busca com os termos “Alzheimer” e “*sensor or biosensor*” em resumos na base de dados Web of Science foram encontrados ao todo 1.692 publicações, destas sendo 263 artigos de revisão e excluindo quatro (4) artigos retratados, publicados desde o ano de 1992 até o ano de 2025, conforme apresentado na Figura 1. Observa-se um aumento significativo no interesse pelo desenvolvimento de biossensores para a detecção de biomoléculas associadas à DA do ano de 2017 até o presente momento.

Os métodos eletroquímicos de análise apresentam vantagens como a obtenção de resultados rápidos, através de técnicas sensíveis, que muitas vezes demandam poucas etapas de montagem, além da possibilidade de obter resultados precisos com pouco ou nenhum preparo de amostra. Portanto, realizou-se uma busca visando obter resultados para biossensores eletroquímicos para a DA, uma vez que este é o foco do trabalho aqui desenvolvido. Desse modo, ao realizar a busca anterior acrescentando-se o termo “*electrochemical*” com o indicador booleano “*and*” em resumos, o número de trabalhos é reduzido para 286, publicados desde o ano 1992 até o ano de 2025, considerando-se a data da pesquisa, destes sendo 47 artigos de

revisão. Esse comparativo, observado na Figura 1, demonstra que há uma quantidade relativamente pequena de trabalhos publicados para sensores e biossensores eletroquímicos para a DA, quando comparados com publicações para as demais técnicas. Por outro lado, observa-se um aumento nos trabalhos publicados nos últimos anos. Uma nova busca foi então realizada mantendo o termo “Alzheimer” e substituindo o termo “*electrochemical*” por “*electrochemical impedance spectroscopy or square wave voltammetry or cyclic voltammetry*” em resumos, visando encontrar trabalhos onde tais técnicas eletroquímicas são empregadas. Foram encontrados 190 resultados de 2003 a 2025, sendo quatro (4) destes artigos de revisão, para trabalhos com o propósito de utilizar as técnicas eletroquímicas citadas para a detecção de biomarcadores da DA.

Figura 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 1995 e 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “*sensor or biosensor*” contendo ou não o termo “*electrochemical*” no resumo



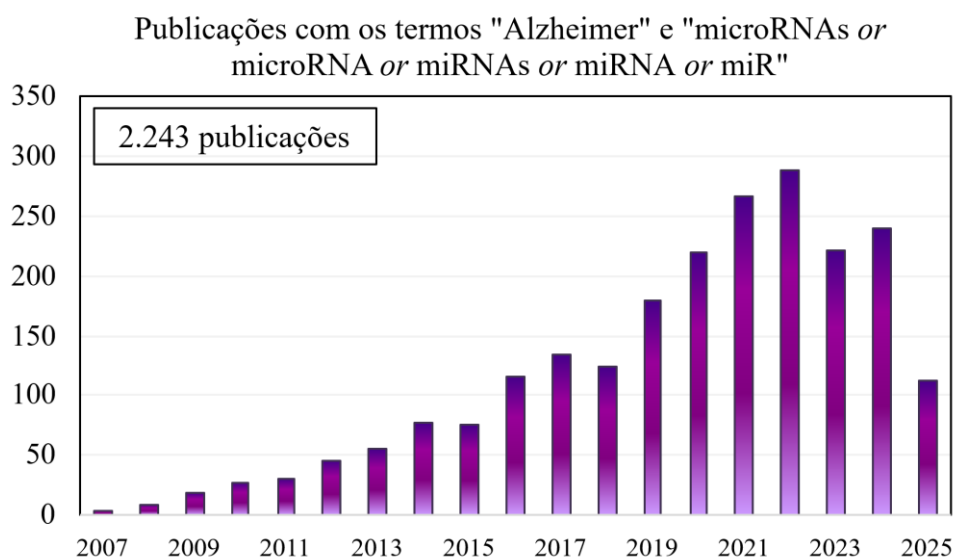
Fonte: A autora.

Realizou-se também uma pesquisa contendo somente os termos “Alzheimer” e “*electrochemical*” em resumos, resultando em 666 publicações entre os anos 1986 até o ano de 2025. Entretanto, alguns desses trabalhos referiam-se a processos eletroquímicos envolvidos nas moléculas e não especificamente à detecção por técnicas eletroquímicas de biomarcadores associados à DA.

Os mecanismos da DA ainda não são completamente compreendidos, mas conforme os estudos avançam, novos biomarcadores começaram a ser investigados. Foi observado que alguns miRNAs específicos encontram-se alterados em diversas doenças, tais como diversos tipos de cânceres, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas, tais como o Parkinson e a DA (Juźwik *et al.*, 2019; Thapa *et al.*, 2022). Nesse sentido, o papel dos miRNAs nas DNs

em geral e na DA tem sido cada vez mais compreendido (Samadian *et al.*, 2021), demonstrando a potencialidade dessas moléculas tanto como alvo terapêutico, quanto como diagnóstico. Ao realizar uma pesquisa contendo os termos “Alzheimer” e “microRNAs *or* microRNA *or* miRNAs *or* miRNA *or* miR”, em resumos, considerando todas as variações possíveis para miRNA, são encontrados 2.243 resultados do ano de 2007 até o ano de 2025 (Figura 2), dos quais 558 trabalhos são artigos de revisão, e excluindo-se 20 resultados de publicações retratadas e 1 resultado de uma publicação de 1992 em que o termo não estava relacionado com miRNAs, especialmente considerando o descobrimento e registro dessas moléculas apenas em 1993 (Hammond, 2015). Observa-se um crescente interesse nessa área ao longo do tempo, com mais de 200 artigos publicados a cada ano desde 2020.

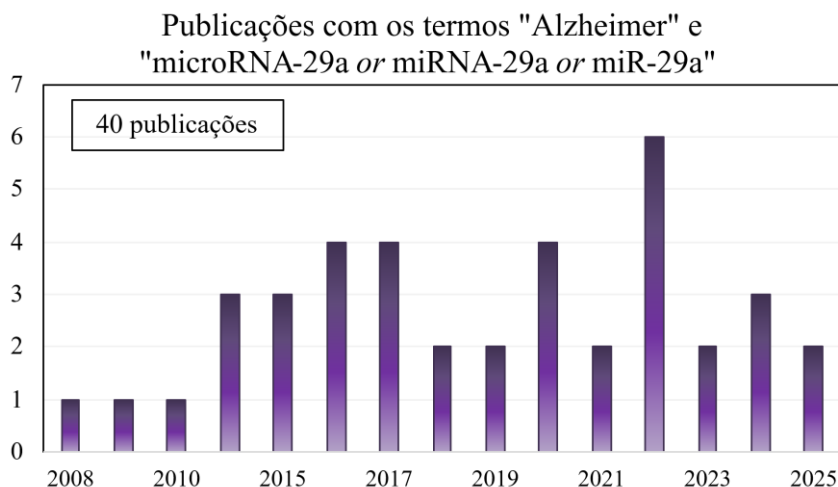
Figura 2 - Trabalhos publicados de 2007 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNAs *or* microRNAs *or* miRNAs *or* miRNA *or* miR”.



Fonte: A autora.

Diante de uma série de miRNAs potenciais biomarcadores da DA, estudos demonstram a relevância dos miRNAs 29a e 34a em decorrência da atuação na regulação da BACE1, enzima de grande importância na formação da β A (Kumar *et al.*, 2023). Na Figura 3 estão demonstrados os resultados obtidos quando realizada uma busca utilizando os termos “Alzheimer” e “microRNA-29a *or* miRNA-29a *or* miR-29a” no resumo. Foram encontradas 40 publicações desde o ano de 2008 até o ano de 2025, destes sendo 9 artigos de revisão.

Figura 3 – Trabalhos publicados de 2008 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNA-29a or miRNA-29a or miR-29a” no resumo.

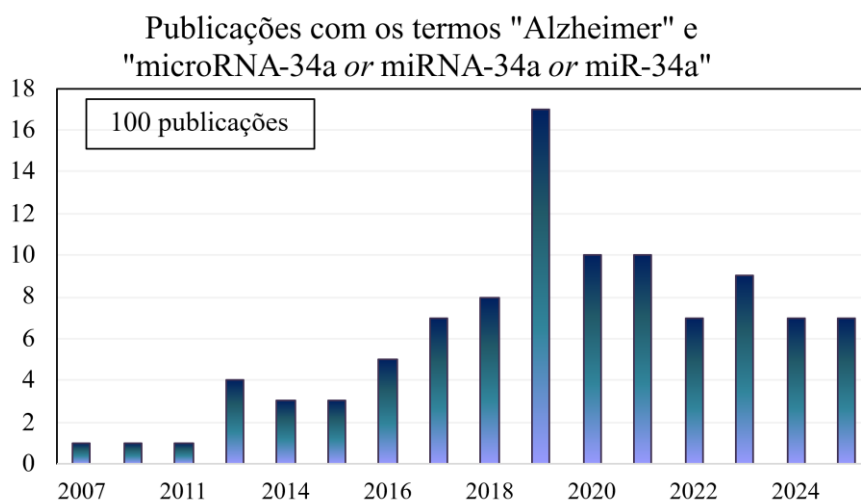


Fonte: A autora.

Ao buscar os termos da primeira análise “Alzheimer” e “*electrochemical*” adicionando os termos “miR-29a or miRNA-29a” em resumos é possível encontrar apenas um (1) trabalho publicado para este miRNA. O mesmo ocorre quando a busca é realizada substituindo-se o termo “*electrochemical*” por “*biosensor*”. Isto demonstra uma lacuna nas pesquisas desenvolvidas para a detecção eletroquímica ou mesmo de outros tipos biossensores para esse miRNA.

Em relação à busca realizada para o miRNA-34a, pesquisando os termos “Alzheimer” e “microRNA-34a or miRNA-34a or miR-34a” no resumo são encontradas 100 publicações, das quais 18 são artigos de revisão, publicadas de 2007 a 2025, conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Trabalhos publicados de 2008 a 2025 encontrados pela base de dados Web of Science contendo os termos “Alzheimer” e “microRNA-34a or miRNA-34a or miR-34a” no resumo.



Fonte: A autora.

Os resultados demonstram um crescimento no número de publicações entre os anos de 2014 e 2019, seguidos por uma queda não linear nos anos seguintes. Por outro lado, quando buscados os termos da primeira pesquisa “Alzheimer”, “*biosensor*” e “*electrochemical*” adicionando-se os termos “miR-34a *or* miRNA-34a” no resumo é possível encontrar apenas quatro (4) trabalhos publicados para este miRNA. Demonstrando novamente uma lacuna existente de pesquisas desenvolvidas para a detecção eletroquímica deste e do miRNA-29a tendo como foco biossensores para a DA, ainda que eles sejam considerados promissores para a sua detecção precoce.

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER E DIAGNÓSTICOS

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença progressiva e debilitante que afeta principalmente os neurônios, causando sérios danos às funções cognitivas ocasionados pela perda de tecido e destruição das células neuronais, que acarretam em sintomas como a perda de memória, irritabilidade e alterações na personalidade nos estágios iniciais, levando até os estágios mais avançados onde há a perda total na autonomia dos pacientes. Apesar do grande avanço nos estudos em relação aos mecanismos da DA, até o momento a doença não possui cura e o seu diagnóstico requer avaliação médica ampla. A maior parte dos casos de DA acomete idosos acima de 65 anos de idade, sendo denominada como Doença de Alzheimer de início tardio, ou DA esporádica. Os demais casos abaixo dessa faixa etária são considerados raros e são conhecidos como Doença de Alzheimer de início precoce, ou DA familiar. As principais características patológicas da DA são a perda dos neurônios e das sinapses, o acúmulo extracelular de placas β -amiloides (β A) ocasionando ativação dos astrócitos e, consequentemente, a ativação das micróglia, células imunológicas do sistema nervoso central, além do acúmulo extracelular de proteína tau resultando em emaranhados neurofibrilares. A deposição da β A é o primeiro sintoma da fase pré-clínica da DA, seguida da formação dos emaranhados neurofibrilares devido a agregação da p-tau, resultando em neurodegeneração, disfunção e perda sináptica (Long; Holtzman, 2019; Kumar *et al.*, 2023). Há indicações de que a transcrição da proteína β A pode ser influenciada pelas isoformas do gene APOE. O gene APOE apresenta as isoformas APOE-e2, APOE-e3 e APOE-e4, as quais desempenham diferentes papéis em relação à β A, sendo que o alelo APOE-e4 parece apresentar a maior influência na transcrição da proteína precursora da β A. O alelo APOE-e4 é considerado de maior implicação como fator de risco para o desenvolvimento da DA esporádica e é atualmente

um biomarcador conhecido para a DA (Alzheimer's Association, 2019; Jackson; Hyman e Serrano-Pozo, 2024).

Um dos principais critérios que compõe o diagnóstico *post-mortem* da DA é a presença de placas β A no cérebro dos pacientes (Cacabelos R.; Cacabelos P.; Torrellas, 2014). A enzima β -secretase (BACE1), enzima de clivagem da proteína precursora amiloide de sítio beta 1 (APP), encontrada abundantemente no cérebro em variados tipos de células neuronais, inclusive nos neurônios, localizada na membrana plasmática e nos compartimentos endossomais, tem sido amplamente estudada por atuar diretamente na produção da β A. Em conjunto com o complexo protease γ -secretase, a BACE1 atua na produção de espécies β A que, na presença da DA, formam grandes agregados no cérebro. É estabelecido que mutações na APP, a qual é abundantemente expressa nos neurônios e nas sinapses, próximas aos sítios β -secretase, desempenham uma relação protetiva e/ou causadora da DA precoce e, sabe-se ainda, que a clivagem da APP pela BACE1 é um fator limitante para a produção da β A. A APP é uma proteína transmembranar do tipo I e a sua função ainda permanece incerta, porém, estudos apontam que ela atua na plasticidade sináptica, na neurotransmissão e na manutenção das espinhas dendríticas, encontradas nos dendritos (Hampel *et al.*, 2021).

Evidências sugerem que os processos patofisiológicos da DA se iniciam até uma década antes do surgimento dos sintomas clínicos da doença (Sperling *et al.*, 2011). Compor um diagnóstico preciso para a DA é desafiador, especialmente nos estágios iniciais, por isso, além de auxiliar para o correto diagnóstico, o uso de biomarcadores pode fornecer informações importantes para um diagnóstico precoce, para diferenciar a DA de outras demências e também pode contribuir na identificação de indivíduos com disposição de desenvolverem a DA, como pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL), possibilitando retardar a progressão da doença e até mesmo preveni-la (O'Bryant *et al.*, 2016). A *Alzheimer's Association*, principal organização mundial sem fins lucrativos de cuidados e pesquisas sobre a doença, reconhece atualmente as potencialidades da utilização de biomarcadores, tais como o acúmulo de fragmentos de proteínas tau e β A, obtidos por técnicas de imagem ou líquido cefalorraquidiano (LCR), para contribuir na elaboração de um diagnóstico para a DA (Jack Jr., *et al.*, 2018). A associação também considera promissores os estudos realizados em busca de biomarcadores sanguíneos para a doença, visando o uso de técnicas menos caras e invasivas.

Os biomarcadores *in-vivo* mais retratados na literatura para a DA são a proteína tau hiperfosforilada (P-tau) e os depósitos de peptídeo β -amiloide (β A42, β A42/ β A40). Pesquisas realizadas analisando a concentração de BACE1 encontrada no LCR demonstraram permitir a distinção entre pacientes de DA para pacientes com CCL e indivíduos saudáveis, bem como

ressaltaram como os biomarcadores sanguíneos da BACE1 obtiveram resultados positivos nessa distinção (Hampel *et al.*, 2021). Devido à conexão do LCR com o sistema nervoso central, esta seria a principal fonte de informações sobre anormalidades bioquímicas no cérebro, possibilitando o acompanhamento dos níveis de β A42, β A42/ β A40 e da proteína Tau. Contudo, para obtenção da LCR para a realização das análises é necessário que o paciente seja submetido a uma punção lombar, um procedimento bastante invasivo e desconfortável. O rastreamento dessas anormalidades também pode ser realizado pela Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET-CT), cuja tecnologia do aparelho une os recursos diagnósticos de Medicina Nuclear (PET) e da Radiologia (CT), entretanto, esse é um exame de difícil acesso, pois demanda alto custo e pessoal qualificado para a sua realização (Leuzy *et al.*, 2021).

As limitações observadas nas técnicas realizadas para o diagnóstico de biomarcadores da DA impulsionaram as pesquisas na busca de biomarcadores sanguíneos da doença. Por ser menos invasiva, a utilização de biomarcadores sanguíneos apresenta uma grande vantagem em relação às demais, possibilitando também a redução de custos e o tempo de análise. Por outro lado, a presença de interferentes é um dos principais problemas enfrentados nos ensaios realizados para mensurar os biomarcadores da DA em plasma. Deste modo, visando minimizar essa dificuldade, diversos estudos para a detecção da β A foram desenvolvidos empregando técnicas como os ensaios multiplex na plataforma x-MAP, os ensaios de imunoprecipitação associados à espectrometria de massa (IP-MS) e os imunoenaios ultrasensíveis SiMoA (do inglês - *Single Molecule Array*). Ainda que tenham demonstrado uma boa performance, os estudos realizados utilizando essas plataformas ainda carecem de mais desenvolvimento e possuem um alto valor para o uso em larga escala (Leuzy *et al.*, 2021). Esses empecilhos evidenciam a necessidade de buscar técnicas mais acessíveis e precisas para detecção de biomarcadores sanguíneos para a doença, sendo esta, inclusive, uma das sugestões da *Alzheimer's Association*.

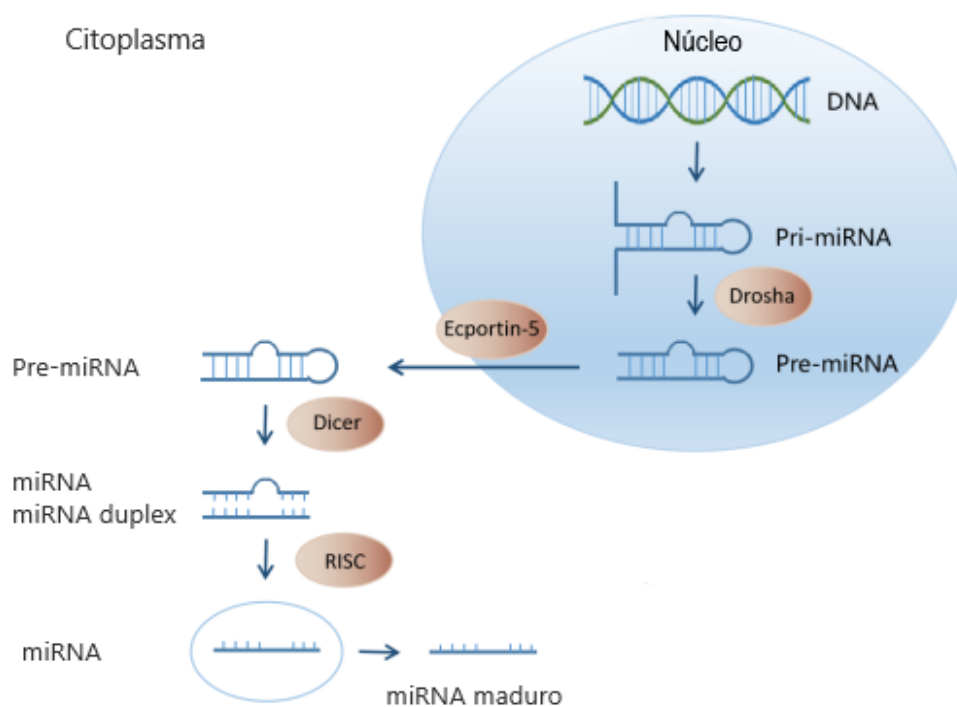
2.3 microRNAs E A DOENÇA DE ALZHEIMER

Uma das principais vantagens que torna promissora a utilização de miRNAs como biomarcadores para doenças neurodegenerativas é a sua estabilidade em fluidos circulatórios, associada às membranas e complexos de ribonucleoproteínas nos quais eles estão contidos e que os protegem da degradação (Lusardi *et al.*, 2017). Além disso, eles estão associados a diversos processos fisiológicos, tais como proliferação e apoptose celular, processos inflamatórios e fibrose (Jorge *et al.*, 2021). Ao utilizar biomarcadores presentes em fluidos circulatórios é possível tornar os processos necessários para o diagnóstico menos invasivos e

onerosos, especialmente diante da possibilidade de analisar fluidos de fácil acesso como sangue e urina.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes, contendo entre 17 e 25 nucleotídeos, ou seja, que não codificam sequências de proteínas. Eles se ligam prioritariamente na região 3' não traduzida (3' UTR – do inglês *untranslated region*) dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvo controlando a expressão gênica através da degradação ou reprimindo a tradução (Hebért *et al.*, 2008; Jorge *et al.*, 2021). Resumidamente, o processo canônico de biogênese dos miRNAs (Figura 5) ocorre inicialmente no núcleo onde os miRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II em uma estrutura *hairpin* denominada pri-miRNA, a qual é clivada em pré-miRNA por um complexo microprocessador composto pela RNase III Drosha que atua em conjunto com a proteína DGCR8 (do inglês - *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) ou Pasha. Após esse processo, com o auxílio das proteínas exportina-5 e RAN-GTP, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma, onde a enzima Dicer realiza a segunda etapa de clivagem originando um miRNA de fita dupla (Ha; Kim, 2014; Jorge *et al.*, 2021; Liu, J. *et al.*, 2022). Associa-se a esse miRNA de fita dupla o complexo proteico RISC e ocorre na sequência a separação das fitas, onde uma fita corresponde ao miRNA maduro ainda associado ao RISC e pronto para parear com o mRNA alvo e a outra costuma ser degradada.

Figura 5 – Processo canônico de biogênese dos microRNAs.



Fonte: Adaptado de Liu, J. *et al.*, 2022.

Os miRNAs possuem um papel essencial na patogênese de muitas doenças e na estabilidade dos processos biológicos, pois, estima-se que nos mamíferos eles atuem na regulação da atividade de cerca da metade dos genes codificadores de proteínas (Liu, J. *et al.*, 2022; Liu, S. *et al.*, 2022). Ainda que todos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das DNs não estejam completamente esclarecidos, destaca-se a importância da expressão desregulada de miRNAs no desenvolvimento de várias dessas doenças, inclusive na DA (Jużwik *et al.*, 2019; Thapa *et al.*, 2022). Foi observado que alguns dos miRNAs que são encontrados desregulados nas DNs também estão sendo considerados como potenciais supressores tumorais, como as famílias do miRNA-34, do miRNA-29 e do miR-9, indicando que os mecanismos de regulação, diferenciação e morte celular possuem vias semelhantes para esses miRNAs no desenvolvimento do câncer e das DNs (Saito, Y.; Saito, H., 2012). Diante da variedade de miRNAs atuantes nas DNs e na atuação dos mesmos miRNAs em doenças diversas, apresenta-se o desafio de constituir um agrupamento de miRNAs que torne possível diferenciar as DNs de outras doenças e, mais especificamente, a DA de outras DNs com sintomas semelhantes.

Há uma série de miRNAs que desempenham um papel crucial no desenvolvimento da DA, atuando na regulação da expressão gênica de proteínas e enzimas de grande importância. Os miRNAs miR-9, miRNA-29a, miR-107, miR-125b, miR-34a e miR-135b estão associados à expressão da BACE1, enquanto que o miRNA-29a possui como alvo também o gene NAV3, o miR-107 a ADAM10 e o miR-135b tem como alvo a sirtuína 1 (SIRT1), uma enzima que age protegendo o cérebro da DA. Outros miRNAs de considerável relevância para a patologia da DA são o miR-106b e o miR-132, pois ambos atuam na supressão da APP, sendo que o miR-132 atua também induzindo a fosforilação da p-tau e a apoptose (Kumar *et al.*, 2023).

O estudo da família dos miRNAs-29 é relevante principalmente porque eles atuam regulando a expressão gênica da enzima de clivagem BACE1, a qual está associada ao desenvolvimento da DA esporádica, bem como agem também na regulação do DNA metiltransferase 3A e 3B, sendo que o fator epigenético de metilação do DNA, que ocorre com a transferência de um grupo metil da s-adenosilmetionina para carbono 5 da citosina, encontra-se alterado na presença da DA (Hebért; De Strooper, 2009; Yang *et al.* 2015). Ainda que não tenham sido esclarecidos todos os mecanismos que culminam na acumulação da β A em pacientes de DA esporádica, é observada uma expressão aumentada da BACE1 nesses pacientes, sugerindo uma correlação entre o desenvolvimento da doença e os altos níveis de

BACE1, uma vez que a sua atuação na clivagem da APP é determinante na produção da β A (Saito, Y.; Saito, H., 2012).

Hébert *et al.* (2008) realizaram um ensaio de luciferase contendo a 3' UTR da BACE1 humana a fim de analisar a potencial influência de alguns miRNAs na regulação da expressão da BACE1. O ensaio demonstrou que o miRNA-29a, o miRNA-29b-1 e o miRNA-9 afetaram significativamente a expressão da luciferase, enquanto outros miRNAs associados não demonstraram efeito. Entretanto, o estudo realizado pelos autores não encontrou correlação entre a expressão do miR-9 e da BACE1 no desenvolvimento cerebral e na DA, enquanto confirmou essa correlação para os miRNAs-29a e -29b-1. Ainda nesse trabalho, testes realizados com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa Quantitativa (RT-qPCR) para um subgrupo de pacientes com DA com altos níveis de BACE1, evidenciaram uma redução significativa nas expressões dos miRNA-29a e -29b-1 quando comparadas ao grupo controle, a pacientes com níveis normais de BACE1 e a pacientes com outros tipos de demências não-Alzheimer.

Um estudo realizado por Shioya *et al.* (2010) evidenciou o papel do miRNA-29a na patologia da DA ao realizar a análise de 723 miRNAs humanos por microarranjos de DNA seguidas de análises quantitativas de RT-PCR para estudo de população. As análises, que foram realizadas em amostras de tecido cerebral de pacientes com DA, Doença de Parkinson (DP), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e pacientes controle, destacaram três miRNAs super-expressos nos cérebros de pacientes com ELA, sendo eles: miRNA-29a, miRNA-29b e miRNA-338-3p. Apesar dessa correlação, os resultados para a ELA não puderam ser validados por RT-PCR, entretanto, foi identificado um decaimento expressivo do miRNA-29a nos cérebros de pacientes com DA. Além disso, observou-se uma interação entre o miRNA-29a e o gene NAV3, o qual encontra-se elevado no cérebro de pacientes com DA, sugerindo que a baixa expressão do miRNA-29a pode influenciar nos processos neurodegenerativos pela elevação do NAV3. Ainda assim, o papel do NAV3 na Doença de Alzheimer ainda não está bem estabelecido na literatura. Estudos relatam a expressão alterada do miRNA-29a no plasma sanguíneo de pacientes com DA (Barbagallo *et al.*, 2020; Sivalingam; Sureshkumar, 2025) destacando-o como um promissor biomarcador para a doença. Considerando que o miRNA-29a é conhecido por atuar também em outras doenças, a melhor abordagem para o diagnóstico de Alzheimer seria detectar uma combinação de miRNAs com atuação nos mecanismos da DA, diferenciando-a de outras doenças.

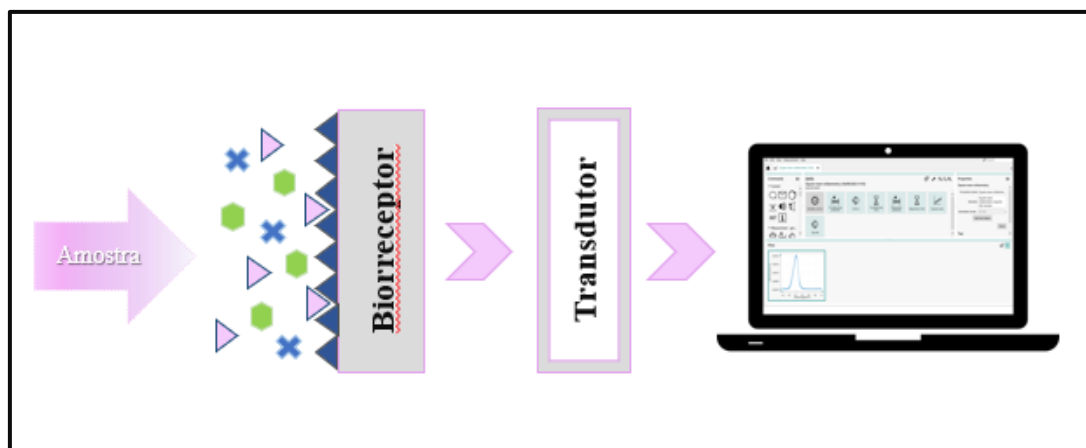
É relatado na literatura que o miRNA-34a encontra-se superexpresso em regiões do cérebro de portadores da DA e de Degeneração Macular relacionada à idade (DMRI), como em

tecidos do neocórtex e da retina. Quando comparado a outros miRNAs também superexpressos nessas regiões, observou-se que o miRNA-34a foi o que manifestou maior superexpressão no cérebro afetados pela DA, reforçando essa correlação. Além disso, a maior parte dos alvos do miRNA-34a está relacionada a codificação de uma glicoproteína transmembranar presente nas células da micróglia denominada TREM2, a qual participa na remoção e na sinalização da amilóide (Pogue; Lukiw, 2018). Estudos demonstram que o miRNA-34a também atua na regulação da atividade da BACE1, bem como na apoptose dos neurônios, destacando o potencial desse miRNA como biomarcador para a DA (Samadian *et al.*, 2021).

2.4 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Diversos estudos são relatados na literatura visando aprimorar a detecção de biomarcadores para variadas doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, cânceres e DNs e, buscando suprir essa lacuna, a pesquisa na área de biossensores eletroquímicos está em constante desenvolvimento (Kim *et al.*, 2021; Liu R.; Ye; Cui, 2020). Em relação às demais técnicas, os métodos eletroanalíticos são considerados mais simples, rápidos e econômicos, oferecem resultados precisos, além de demonstrarem potencial de miniaturização (Magar *et al.*, 2021). Os biossensores eletroquímicos realizam a conversão de uma resposta biológica em um sinal elétrico mensurável, tais como corrente, voltagem ou impedância (Grieshaber *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2021). De maneira geral, eles são compostos pelos seguintes elementos: a interface, biorreceptores, os elementos de transdução e um sistema eletrônico de processamento do sinal (Figura 6). É na interface onde os eventos biológicos específicos para detecção acontecem, gerando um sinal que será convertido em um sinal elétrico pelo transdutor. Diante da possibilidade de incorporar biorreceptores que necessitam de uma afinidade de ligação específica com a molécula alvo desejada, tais como anticorpos, ácidos nucleicos e enzimas, os biossensores se destacam pela seletividade. É possível realizar a detecção em variados tipos de amostras, inclusive com fluidos biológicos, e quanto menos dependente de parâmetros físicos como pH e temperatura for a reação que ocorre na interface do biossensor, menor será o pré-tratamento necessário para a análise das amostras (Grieshaber *et al.*, 2008). Desta forma, os biossensores também se destacam pela agilidade na obtenção da resposta eletroquímica, exigindo poucos processos de preparação, com alta seletividade e sensibilidade.

Figura 6 - Representação esquemática dos principais componentes de um biossensor.



Fonte: A autora.

A aplicação de biossensores eletroquímicos na detecção de doenças permite a obtenção de resultados de maneira mais acessível, econômica e rápida, especialmente pela possibilidade de obter uma resposta eletroquímica a partir de volumes muito pequenos de amostras. Basicamente, a presença de uma doença pode ser verificada por uma mudança específica de sinal observada e esse resultado pode ser atingido em baixíssimas concentrações do analito, uma vez que a faixa de detecção desses dispositivos costuma ser ampla (Kim *et al.*, 2021).

Devido às possibilidades de miniaturização e da redução significativa no número de etapas necessárias para a realização das análises, pois muitas vezes não necessitam uma preparação das amostras muito complexas, além da alta seletividade, essas plataformas apresentam vantagens frente às outras técnicas de detecção. Adicionalmente, a elaboração de biossensores permite a incorporação de diversos materiais, como os nanomateriais, que contribuem significativamente para o aumento da sensibilidade da técnica empregada, permitindo detectar analitos com limites de detecção (LOD) bastante baixos.

O eletrodo de trabalho é uma parte fundamental na elaboração de um biossensor eletroquímico, porque por ele é que serão observadas as alterações no fluxo de elétrons e na sua superfície é que serão imobilizadas as biomoléculas. Assim, o emprego de materiais funcionais adequados na modificação do eletrodo pode contribuir significativamente para que ele tenha uma boa performance e a imobilização das biomoléculas ocorra de maneira satisfatória (Cho; Kim; Park, 2020; Singh *et al.*, 2021). As nanopartículas metálicas (MNPs), como AuNPs e AgNPs, têm sido amplamente utilizadas na modificação de sensores e biossensores visando o aumento da resposta eletroquímica em razão das suas propriedades catalíticas e condutoras. Devido as MNPs possuírem tamanhos menores do que o material na forma *bulk* e maiores que o tamanho molecular, elas apresentam características únicas (Ghosh; Pal, 2007). A incorporação de materiais funcionais com MNPs tem o potencial de melhorar expressivamente

a performance dos biossensores, aumentando a área superficial e a transferência de elétrons, levando ao aumento da sensibilidade da técnica e ocasionando uma amplificação do sinal. Em especial, características como a biocompatibilidade, a alta estabilidade química e térmica, além da facilidade de funcionalização com moléculas orgânicas e biológicas despertaram grande interesse para aplicação das AuNPs na modificação de biossensores eletroquímicos (Cho; Kim; Park, 2020; Huang; Zhu; Kianfar, 2021). Assim, a modificação da superfície eletródica por materiais com boas propriedades condutoras e que estejam em concordância com a biomolécula escolhida, irá impactar diretamente na sensibilidade e na seletividade do biossensor.

2.4.1 Estratégias de imobilização de biomoléculas em biossensores eletroquímicos

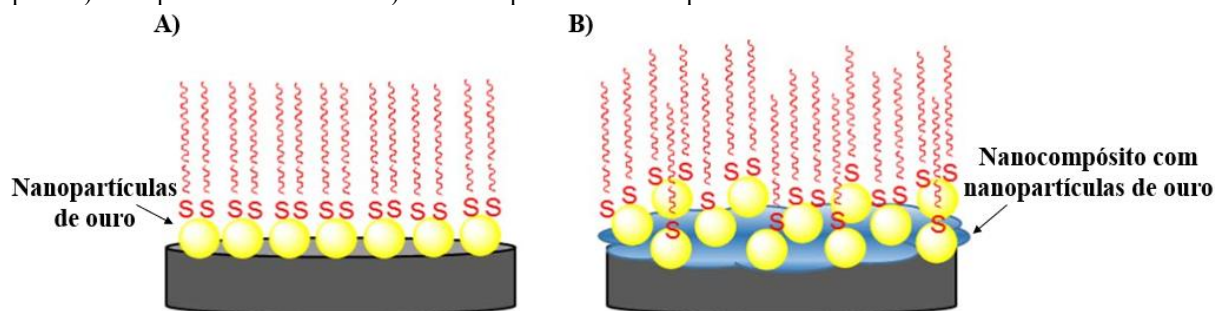
Uma das etapas de crucial importância na construção de um biossensor é o estudo da imobilização das biomoléculas na superfície do eletrodo, uma vez que a organização da monocamada irá impactar diretamente no acesso da molécula alvo e no evento de hibridização. Para a construção de biossensores baseados em DNA ou miRNA a imobilização das sondas pode ser realizada por imobilização direta ou por imobilização indireta. Na imobilização indireta, as sondas de DNA, RNA ou miRNA são imobilizadas em plataformas nanoestruturadas, as quais então serão imobilizadas na superfície do eletrodo por ligação covalente ou por adsorção física. Uma das possíveis limitações desse tipo de abordagem está relacionada à precisão na orientação das fitas imobilizadas, o que pode afetar negativamente a sensibilidade do biossensor ao prejudicar a acessibilidade das biomoléculas alvo. Entretanto, estudos realizados a partir de novas estratégias, como o uso de diferentes arranjos de sondas e de monocamada auto-organizadas (SAMs), tem demonstrado resultados satisfatórios, com limites de detecção (LOD) na faixa femtomolar (Thapa *et al.*, 2022).

No que se refere à imobilização direta, as sondas são imobilizadas diretamente na superfície do eletrodo com o auxílio de nanomateriais, polímeros sintéticos ou de proteínas, por exemplo, sendo possível destacar métodos como adsorção física, ligações covalentes e a interação não-covalente (ex. avidina-biotina). Tais estratégias podem favorecer uma orientação adequada na imobilização das fitas na superfície do ECV, aumentando a sensibilidade. Na adsorção física, ou fisissorção, a imobilização ocorre por meio de interações eletrostáticas ou por forças de Van der Waals entre o polímero catiônico empregado na modificação do eletrodo e a sonda, decorrentes da distribuição de cargas, não havendo necessidade de modificá-la. Entretanto, esse método pode apresentar desvantagens como a perda de sensibilidade e

seletividade em decorrência da acumulação materiais não desejados ou da ocorrência de interações não específicas (Thapa *et al.*, 2022; Rashid; Yusof, 2017).

O método de imobilização da sonda por meio de ligação covalente é uma estratégia que permite a formação de uma ligação mais forte entre a sonda e a superfície do eletrodo, maior estabilidade e a formação de uma SAM. Nessa abordagem geralmente emprega-se um eletrodo metálico ou um eletrodo modificado com MNPs ou outros grupamentos funcionais, enquanto a sonda de DNA é modificada em um dos terminais (3' ou 5') por um grupamento amina (-NH₂) ou tiol (-SH). O desenvolvimento de biossensores empregando a formação de SAMs baseadas na interação tiol tem sido relatado na literatura, especialmente em eletrodos de ouro e eletrodos modificados com AuNPs ou nanocompósitos contendo AuNPs (Lanzellotto *et al.*, 2014; Mossanha *et al.*, 2017). A construção de eletrodos baseados nessa interação pode ser observada na figura 7:

Figura 7 – Representação esquemática da imobilização de sondas de DNA empregando a técnica de quimiossorção para A) Nanopartículas de ouro e B) Nanocompósito com nanopartículas de ouro.



Fonte: Adaptado de Rashid e Yusof, 2017.

A ampla utilização desse método na construção de biossensores de DNA se deve a estabilidade e a força da ligação covalente entre Au-S, conforme demonstrado na semirreação (1), onde R é a sonda DNA modificada com grupamento -SH (Rashid; Yusof, 2017):



Embora a técnica de quimiossorção proporcione uma ligação forte, a imobilização de oligonucleotídeos não modificados na superfície do eletrodo ainda pode ocorrer por meio da fisissorção, o que pode afetar a sensibilidade e a especificidade do biossensor. Para diminuir a possibilidade de ocorrer essa interferência, são retratados trabalhos na literatura onde são empregadas moléculas a fim de bloquear os sítios não ligantes, evitando a ocorrência de ligações não específicas. Uma das moléculas mais empregadas é o mercaptohexanol (MCH), pois a presença dos grupos -OH carregados negativamente presentes em sua estrutura são capazes de prevenir a adsorção de DNA em sítios não específicos na superfície do eletrodo,

pela repulsão das cargas negativas dos grupos fosfato, sem impedir a formação da dupla-fita (Szymczyk *et al.*, 2022). A albumina sérica bovina (BSA) é outra molécula amplamente utilizada com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas, especialmente devido à biocompatibilidade e ao baixo custo. Um estudo realizado por Beykal *et al.* (2015) avaliou alterações na adsorção da BSA em um eletrodo de ouro em decorrência de mudanças observadas na carga superficial quando aplicadas variações de pH e de potencial aplicado. Observou-se que o potencial zeta da BSA muda significativamente de acordo com o pH do meio em decorrência do caráter anfótero da molécula, de modo que em uma faixa de pH abaixo de 4.4 ela apresenta carga positiva e acima disto carga negativa, demonstrando a versatilidade do emprego da BSA.

2.4.2 Classificação dos biossensores eletroquímicos a partir do tipo de transdução eletroquímica

Na eletroquímica, os tipos de biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de transdução eletroquímica, podendo ser devido a uma acumulação de carga, por uma variação de potencial, pela geração de uma corrente mensurável, por alterar as propriedades condutoras de um meio ou por alterações em propriedades como a resistividade. Assim, considerando essas propriedades, é possível considerar as principais classes de biossensores eletroquímicos como: voltamétrico, amperométricos, potenciométricos e impedimétricos, conforme elencado na Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação dos principais tipos de biossensores eletroquímicos, técnicas de análise e princípios.

Tipo de biossensor	Principais técnicas de análise	Princípio
Voltamétrico	VC, VPD, VOQ e LSV	Mede-se a corrente durante varreduras de potencial
Amperométricos	Amperometria e voltametria	Mede-se a corrente gerada por reações redox
Potenciométrico	Potenciometria direta ou eletrodos íon-seletivos (ISE)	Mede-se a variação de potencial gerada por mudanças iônicas
Impedimétricos	EIE	Mede-se a resistência e a reatância

Fonte: A autora.

Um dos principais tipos de biossensores eletroquímicos relatados na literatura é a dos biossensores voltamétricos, onde as informações sobre o analito são obtidas, basicamente, através da aplicação de uma diferença de potencial, verificando as variações de corrente faradaica resultantes. Para esse método são empregadas as técnicas como a Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e

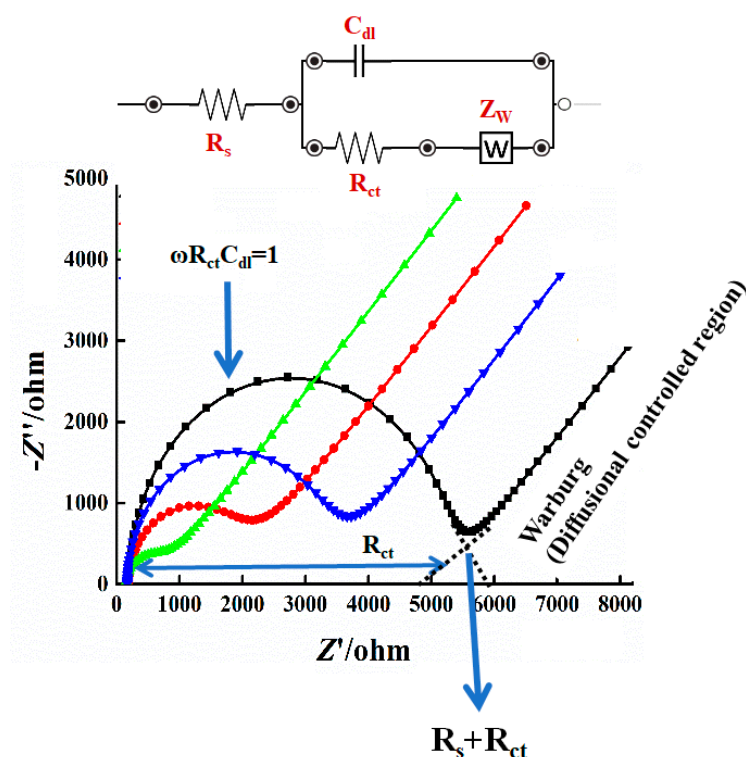
Voltametria de Varredura Linear (LSV) que diferem entre si, principalmente, pelo modo como a variação de potencial ocorre. As técnicas voltamétricas permitem compreender a reatividade do analito, a cinética e os mecanismos das reações de oxirredução. Os biossensores amperométricos medem a corrente resultante da redução ou da oxidação de espécies eletroativas em uma reação bioquímica, para o qual são empregadas as técnicas voltamétricas e também amperométricas. A técnica empregada é denominada amperometria quando essas alterações são medidas sob um potencial constante e voltametria quando são aplicadas variações controladas de potencial, conforme mencionado anteriormente. Como nem todos os analitos possuem a capacidade de atuar como par redox é comum que sejam utilizados mediadores nesse tipo de biossensores. Há também a cronoamperometria, em que potencial de onda quadrada é aplicado e a corrente, que sofre alterações em decorrência de variações na camada de difusão, é medida em função do tempo. Outro tipo de biossensores, os biossensores potenciométricos, fornecem informações sobre a atividade iônica em uma reação eletroquímica ao medir a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência quando a corrente entre eles não é significativa ou é praticamente zero. Nesse tipo de análise, a concentração do analito pode ser relacionada com as alterações de potencial (Grieshaber *et al.*, 2008; Magar *et al.*, 2021).

Especificamente, a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é a técnica empregada na classe de biossensores denominados impedimétricos (Singh *et al.*, 2021). A técnica de EIE analisa a resistência elétrica e a reatância, os quais são, respectivamente, os elementos reais e imaginários que compõe a impedância complexa, medida em ohms. Por meio dessa técnica, é possível estudar alterações em propriedades como a resistividade e a condutividade ocasionados em um sistema por um processo ou pelas propriedades de um determinado material. Tratando-se de biossensores, pode-se mensurar as mudanças ocorridas na superfície do eletrodo decorrentes de eventos de biorreconhecimento, como por exemplo reações de antígeno-anticorpo ou hibridização de fitas de DNA (Grieshaber *et al.*, 2008).

Os processos eletroquímicos que ocorrem em uma célula eletroquímica, como a transferência de massa e de carga na interface eletrodo/eletrólito, bem como a concentração das espécies eletroativas e a resistência do eletrólito, são representadas por um circuito elétrico constituído por elementos como resistores e capacitores, formando um circuito equivalente. O circuito equivalente auxilia na compreensão de cada um dos componentes do sistema e, desse modo, ao empregar o circuito equivalente de Randles, amplamente utilizado na EIE, obtém-se a resistência da solução (R_s), a resistência a transferência de carga (R_{ct}), a capacitância da dupla camada na superfície do eletrodo (C_{dl}) e a resistência de Warburg (Z_w), referente ao processo de difusão que ocorre na interface eletrodo/eletrólito. Os resultados obtidos em uma impedância

podem ser expressos em dois tipos de diagramas, o de Nyquist, formado quando o elemento real (Z') é plotado no eixo X e o elemento imaginário ($-Z''$) é plotado no eixo Y, e o de Bode, que compreende duas funções logarítmicas separadamente: fase x frequência e magnitude x frequência (Magar *et al.*, 2021). O diagrama de Nyquist compreende duas regiões, uma semicircular que representa os processos de transferência de elétrons e uma região formada por uma linha reta que representa o processo difusional (Singh *et al.*, 2021). A Figura 8 representa o diagrama de Nyquist e o circuito equivalente de Randles para espectros de impedância eletroquímica, tal que os dados de R_s , R_{ct} e W constituem Z' :

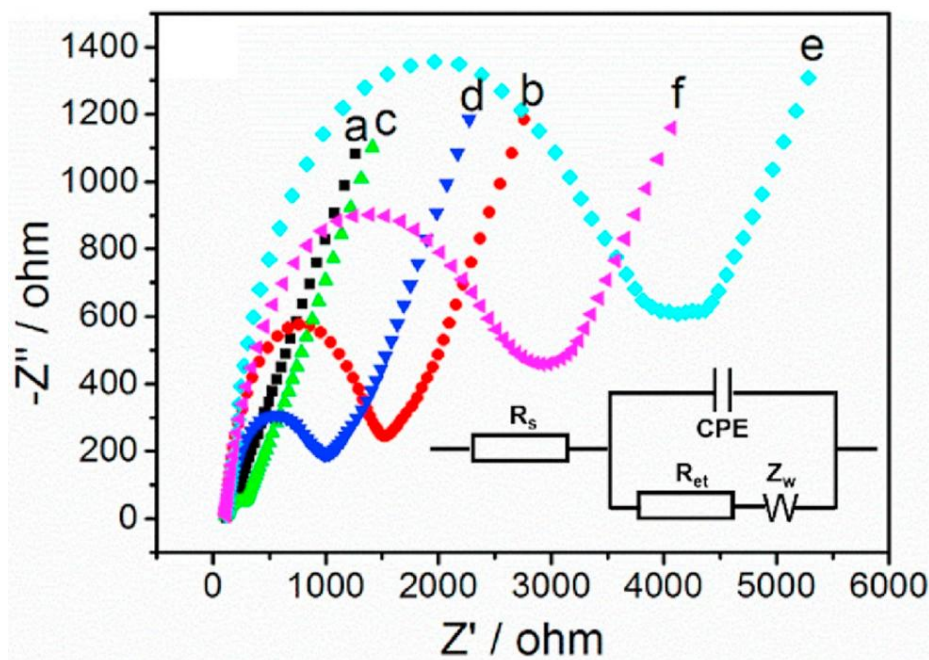
Figura 8 – Circuito equivalente de Randles e diagrama de Nyquist para espectros de impedância eletroquímica.



Fonte: Magar *et al.*, 2021.

A resistência à transferência de elétrons é proporcional ao diâmetro da região semicircular, portanto, quanto mais lento é o processo de transferência, maior é a região do semicírculo, enquanto que em processos bastante rápidos há a formação somente de uma linha reta. No caso dos biossensores, após a ocorrência de um evento biológico na superfície do eletrodo como uma interação antígeno/anticorpo, o R_{ct} tende a aumentar, por isso a maior preocupação é pela correta imobilização da sonda de interesse na superfície do eletrodo (Singh *et al.*, 2021). Um exemplo desta etapa de biorreconhecimento pode ser observado nos diagramas de Nyquist da Figura 9 para as diferentes etapas na detecção do miRNA-21, obtidos por um biossensor desenvolvido por Ma *et al.* (2020):

Figura 9 – Diagramas de Nyquist para as diferentes etapas de construção de um biossensor para a detecção do miRNA-21 a partir de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nitreto de carbono e AuNPs.



Fonte: Adaptado de Ma *et al.*, 2020.

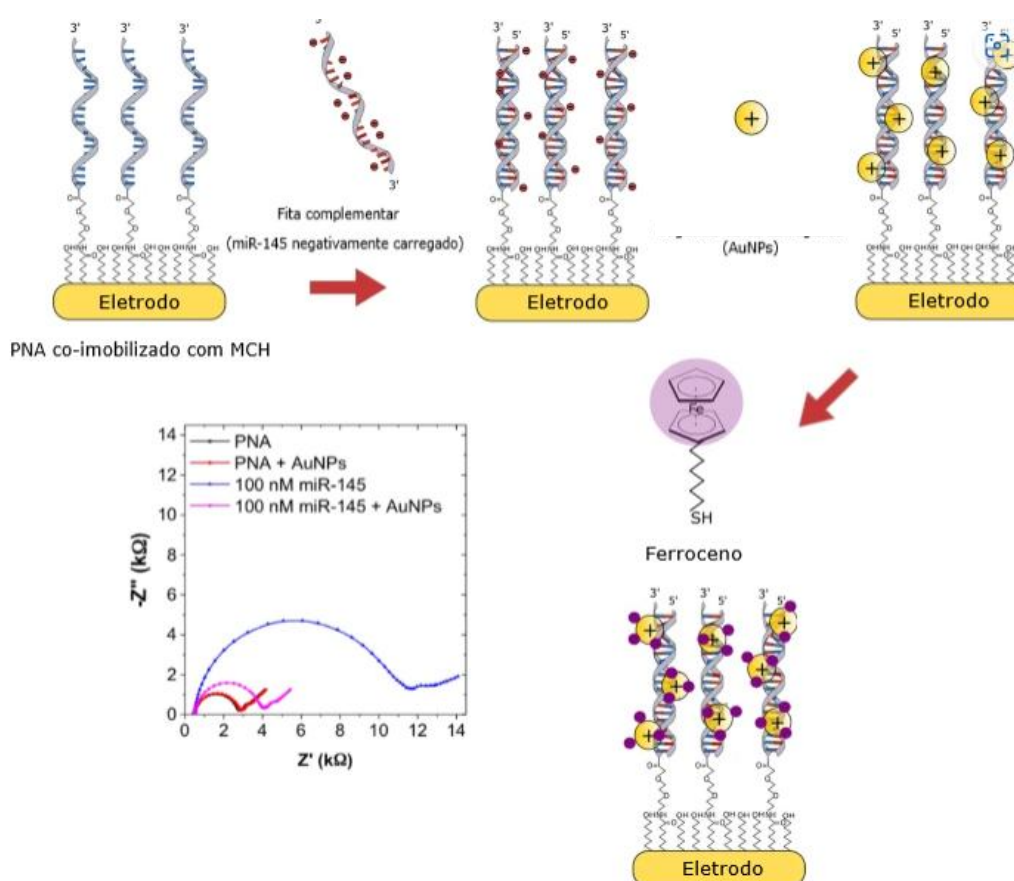
Os diagramas de Nyquist de *a* até *d* são referentes às etapas de modificação do eletrodo, evidenciadas pelos semicírculos menores. Os diagramas para *e* e *f*, os quais são referentes às etapas de imobilização do miRNA-21 e do miRNA-21 alvo tratado com uma enzima nuclease, apresentam semicírculos consideravelmente maiores do que os anteriores. Esse efeito é atribuído pela repulsão eletrostática entre as cargas negativas da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e as cargas negativas presentes na estrutura do miRNA, dificultando a transferência de elétrons (Ma *et al.*, 2020).

2.4.3 Biossensores eletroquímicos na detecção de microRNAs

Além do papel fundamental que os miRNAs desempenham na regulação de diversas doenças, miRNAs circulantes demonstram propriedades como a resistência a variações de temperatura e pH, assim como alta estabilidade em fluidos biológicos (Chen *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2014; MITCHELL *et al.*, 2008). Em virtude dessas características, uma diversidade de trabalhos encontrados na literatura tem relatado a elaboração de biossensores eletroquímicos para a detecção de miRNAs como biomarcadores, principalmente para alguns tipos de câncer. Jolly *et al.* (2016) construíram uma plataforma eletroquímica *dual mode* para a detecção do miRNA-145, considerado como um supressor tumoral associado a diversos tipos de câncer, empregando AuNPs carregadas positivamente modificadas com o polímero polietilenoimina

como um amplificador de sinal. A plataforma (Figura 10) foi baseada em um sistema tradicional de três eletrodos, contendo um eletrodo de trabalho de ouro no qual uma sonda tiolada de ácido nucleico peptídico (PNA – do inglês *Peptide nucleic acid*) foi imobilizada para a formação de um duplex PNA/miRNA na presença do alvo miRNA-145. Nesse sistema, as AuNPs carregadas positivamente se ligam no duplex PNA/miRNA causando um aumento significativo na capacitância. Foram utilizadas as técnicas de EIE para monitorar as mudanças nas propriedades dielétricas e variações na capacitância do sistema e de VOQ para verificar a disponibilidade das AuNPs na superfície do duplex PNA/miRNA para a incorporação de ferroceno tiolado, monitorando os picos de oxidação do ferroceno com o aumento da concentração do miRNA, como forma de validar o evento de formação do duplex. O biossensor alcançou um LOD de 0,37 fM e demonstrou ser uma alternativa para minimizar falsos positivos e obter resultados mais precisos.

Figura 10 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor *dual-mode* desenvolvido para a detecção do miRNA-145.



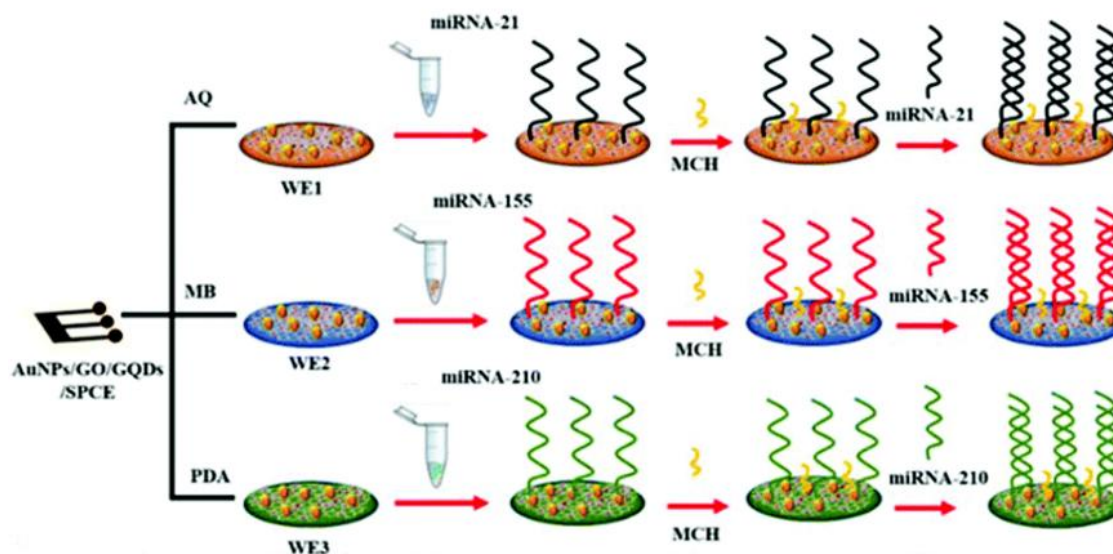
Autor: Adaptado de Jolly *et al.*, 2016.

Um dispositivo impresso para detecção do miRNA-21 em amostras de urina foi desenvolvido por Cimmino *et al.* (2022) baseado em um sistema de eletrodos de ouro

impressos. O miRNA-21 é conhecido pelo seu papel regulador e pela associação com diversos tipos de câncer, como câncer de mama, próstata e cólon. A plataforma foi modificada com a imobilização de uma sonda de DNA modificada com azul de metileno como indicador redox sobre a superfície do eletrodo e o evento de reconhecimento da hibridização do alvo foi verificada pelas mudanças ocorridas na transferência de elétrons através da técnica de VOQ, apresentando um LOD na faixa de 2,0 nM em amostras reais.

Em outro trabalho, Pothipor *et al.* (2021) desenvolveram um biossensor multiplex visando identificar o câncer de mama em estágios iniciais pela detecção simultânea de três miRNAs como biomarcadores para a doença. De acordo com os autores, foram utilizados três miRNAs visando aumentar a precisão diagnóstica. A plataforma (Figura 11) consistiu em um eletrodo impresso de carbono (EPC) elaborado de forma a conter três eletrodos de trabalho, modificados com um compósito de AuNPs, óxido de grafeno (GO) e *quantum dots* de grafeno (GQDs).

Figura 11 – Representação esquemática de um biossensor multiplex baseado em um eletrodo de trabalho triplo feito de carbono modificado com AuNPs/GO/GQDs utilizando antraquinona (AQ), azul de metileno (MB) e polidopamina (PDA) como indicadores redox para detecção de miRNAs específicos.



Fonte: Adaptado de Pothipor *et al.*, 2021.

Além da incorporação do nanocompósito, os autores utilizaram três indicadores redox, um em cada eletrodo de trabalho, a fim de obter três sinais eletroquímicos em potenciais distintos para a detecção de cada um dos miRNAs alvo pela técnica de VOQ, sendo eles: antraquinona para o miRNA-21, azul de metileno para o miRNA-155 e polidopamina para o miRNA-210. Neste trabalho o mercaptohexanol (MCH) foi empregado a fim de bloquear os sítios de ligação e evitar ligações não específicas na superfície do eletrodo. O biossensor foi capaz de detectar simultaneamente em uma faixa linear de 0,001 a 1000 pM as sequências de

miRNA-21, miRNA-155 e miRNA-210 com LOD de 0,004, 0,33 e 0,28 fM, respectivamente, demonstrando boa reprodutibilidade e seletividade frente a oligonucleotídeos interferentes.

2.4.4 Biossensores eletroquímicos a base de microRNAs na detecção da Doença de Alzheimer

Ainda que muitos estudos estejam sendo realizados na área de biossensores para detecção de miRNAs, há um número reduzido de trabalhos encontrados na literatura voltados para a detecção de miRNAs como biomarcadores para a DA a partir de técnicas eletroquímicas. Em sua maioria, as plataformas desenvolvidas visam a detecção do miRNA-34a, considerando-o como um potencial biomarcador para a Doença de Alzheimer e também para diversos tipos de câncer.

Congur, Eksin e Erdem (2018) desenvolveram um biossensor impedimétrico de DNA para a detecção do miRNA-34a a partir de um eletrodo de lápis de grafite (PGE) funcionalizado quimicamente e modificado com GO, sobre o qual foi imobilizada uma sonda de DNA do miRNA-34a modificada com grupo amina na região 5' para possibilitar a ligação covalente com os grupos carboxílicos presentes no GO. O evento de hibridização foi verificado pela técnica de EIE e o biossensor apresentou LOD de 72 nM em soro diluído. Outros trabalhos semelhantes desenvolvidos pelos pesquisadores visando a detecção eletroquímica do miRNA-34a estão listados na Tabela 2.

Mais recentemente, um biossensor para detecção do miRNA-34a foi desenvolvido por Pereira *et al.* (2023) no qual eletrodos de carbono impressos (SPCE) foram modificados por eletrodeposição de AuNPs de duas morfologias distintas, sendo elas do tipo estrela e do tipo floco de neve. As duas nanoestruturas de AuNPs foram eletrodepositadas sobre os eletrodos separadamente, sendo que as de tipo estrela foram obtidas por VC e as de tipo floco de neve por cronoamperometria. Por fim, a plataforma foi funcionalizada com a sonda anti-miRNA-34a. Foram realizados estudos para comparar o desempenho das duas nanoestruturas, onde foi constatado que ambas apresentaram resultados similares, mas que as AuNPs de tipo estrela foram mais favoráveis em promover a ocorrência da hibridização sonda-alvo, sendo essa a morfologia escolhida. O biossensor foi capaz de detectar o miRNA-34a numa faixa linear de 100 pM a 1 μ M com LOD de 94 aM em soro, demonstrando boa especificidade na presença de interferentes.

Um nanobiossensor foi desenvolvido por Azimzadeh *et al.* (2017), com o objetivo de realizar a detecção precoce da DA, a partir da quantificação do miRNA-137. A plataforma foi constituída por um SPCE modificado com óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido e nanofios de ouro (AuNWs – do inglês *gold nanowires*), sobre o qual foi imobilizada uma sonda

ssDNA tiolada específica para o miRNA-137. Foram utilizadas as técnicas de VC e EIE, onde foram observadas as mudanças de corrente de pico (i_p) e resistência de transferência de carga (R_{ct}) para verificar o comportamento eletroquímico do biossensor, o qual demonstrou ser altamente específico, apresentado LOD de 1,7 fM em uma faixa linear de 5,0 a 750,0 fM.

Por outro lado, Miglione *et al.* (2022) desenvolveram um dispositivo eletroquímico, visando a detecção precoce da DA, mas tendo como objetivo a detecção do miRNA-29a, utilizando eletrodos impressos. O eletrodo foi impresso em um filme de poliéster modificado com tintas condutoras de Ag/AgCl, para formação dos contatos e do eletrodo de referência, e carbono para a formação do eletrodo de trabalho e dos contra eletrodos. Sobre a superfície do eletrodo de trabalho foram incorporadas as AuNPs e uma sonda anti-miRNA-29a com indicador redox azul de metileno. O dispositivo foi capaz detectar o miRNA-29a com LOD de 0,15 nM em solução e 0,2 nM em soro sanguíneo enriquecido, demonstrando grande seletividade para o alvo na presença de espécies interferentes.

Na Tabela 2 estão listados os trabalhos encontrados na literatura até o momento para a detecção eletroquímica de miRNAs associados à DA.

Tabela 2 – Trabalhos reportados na literatura para a detecção eletroquímica de miRNAs associados a Doença de Alzheimer.

Alvo	Plataforma	Técnica utilizada	LOD	Referência
¹ miRNA-137	SPCE/GO/AuNWs	VC, EIE	1,7 fM	AZIMZADEH <i>et al.</i> (2017)
² miRNA-107	SPCE/MWCNTs-COOH	VOQ EIS	1.0 pM 7.0 pM	CARNEIRO <i>et al.</i> (2018)
³ miRNA-34a	GO-CA-PGE	EIE	72 nM	CONGUR; EKSIN; ERDEM (2018)
⁴ miRNA-34a	ZNA/MBs/PGE	DPV	10,98 µg/mL	ERDEM; EKSIN (2023)
⁵ miRNA-34a	SPE-CNF	DPV	0,87 µg/mL	ERDEM; EKSIN; CONGUR (2015)
⁶ miRNA-34a	SPCE/AuNPs	EIE	94 aM	PEREIRA <i>et al.</i> (2023)
⁷ miRNA-29a	SPCE/AuNPs	VOQ	0,2 nM	MIGLIONE <i>et al.</i> (2022)
⁸ miRNA-101	Mini-pillar/PDMS/AuNDs	VOQ	91.4 pM	SONG <i>et al.</i> (2020)

1 – Eletrodo impresso de carbono (SPCE) modificado com óxido de grafeno (GO) e nanofios de ouro (AuNWs);
2- SPCE contendo três eletrodos de carbono fabricados com policloreto de vinila (PVC) modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com ácidos carboxílicos (MWCNTs-COOH) 3 – Eletrodo de lápis de grafite (PGE) funcionalizado quimicamente com agentes covalentes (CA) modificado GO; 4

– Ácido nucleico ZIP (ZNA) empregado como sonda para hibridização com miRNA34a, empregados na modificação de um PGE após separação magnética por *magnetic beads* (MBs); 5 – Eletrodos impressos modificados com nanofibras de carbono (SPE-CNF); 6 e 7 – SPCEs modificados com AuNPs; 8 – Plataforma *mini-pillar* modificada com polidimetilsiloxano (PDMS) e eletrodeposição de nanodendritos de ouro (AuNDs) para detecção de múltiplos biomarcadores.

Fonte: A autora.

Conforme observado pelos trabalhos citados, na literatura são encontrados sensores e biossensores modificados com AuNPs e suas diversas morfologias com o intuito de melhorar a resposta eletroquímica e a sensibilidade da plataforma. Elas demonstraram ser altamente eficientes para o diagnóstico de doenças, aumentando significativamente a sensibilidade na detecção dos analitos de interesse devido à alta área superficial e a alta condutividade elétrica das AuNPs. Além do excelente papel que desempenham em imobilizar biomoléculas na superfície eletródica em função da ligação tiol-Au, tornando-se por essa razão vantajosas para a construção de biossensores de DNA. Além disso, as diferentes morfologias dos nanomateriais podem favorecer ainda mais a transferência de elétrons e contribuir com a sensibilidade do biossensor (Bonanni; Del Valle, 2010).

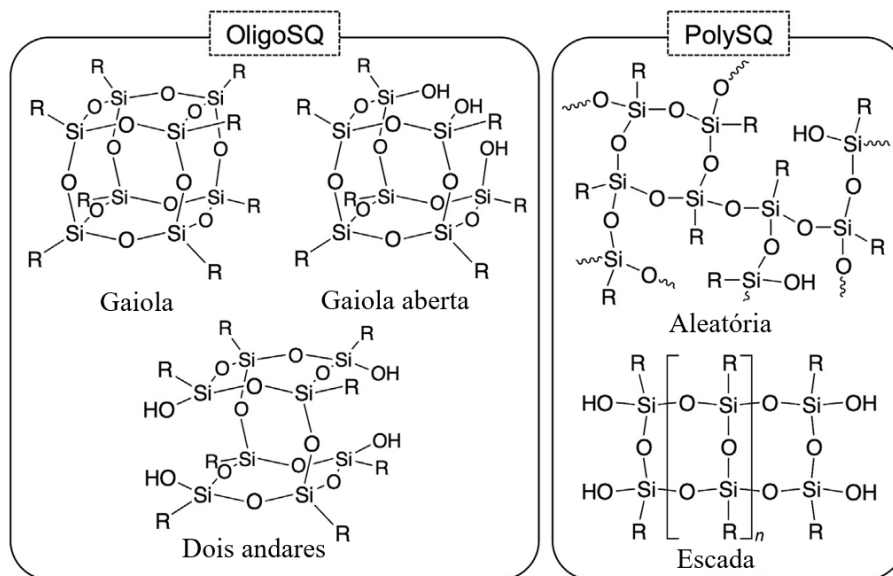
Os estudos aqui relatados demonstram plataformas altamente sensíveis e capazes de detectar sequências de miRNAs específicas para a Doença de Alzheimer a partir de técnicas como VC, VOQ e EIE. Isso evidencia o grande potencial da detecção eletroquímica de miRNAs como biomarcadores não invasivos para o diagnóstico da DA através de dispositivos sensíveis que fornecem resultados rápidos e de maneira eficiente. Entretanto, alguns desses biossensores exigiram processos mais trabalhosos, que demandam técnicas específicas e maior tempo para realizá-las.

2.5 SILSESQUIOXANOS EM SENSORES E BIOSENSORES

Materiais híbridos como os da classe dos silsesquioxanos despertam um crescente interesse para a síntese MNPs em decorrência das propriedades que apresentam, como alta estabilidade térmica e química, e pela biocompatibilidade. Em decorrência da sua versatilidade e pela possibilidade de serem modificados com grupamentos organofuncionais carregados, tornando-os solúveis em meio aquoso, esses materiais podem ter diversas aplicações como em processos de troca iônica, síntese de MNPs e na construção de filmes finos pela técnica de *layer-by-layer* (LbL) (Winiarski *et al.*, 2017). Silsesquioxanos apresentam em repetição a fórmula geral $(\text{RSiO}_{1.5})_n$ onde n significa o número de repetições e R representa qualquer tipo de grupamento orgânico ou H. São materiais híbridos orgânico-inorgânicos que possuem a

grande vantagem de apresentarem características de ambas as classes de compostos, além de serem compatíveis com variados materiais orgânicos, possibilitando diversas combinações e tornando-os bastante versáteis (Kaneko, 2018; Kickelbick, 2014). Os silsesquioxanos podem apresentar padrões variados a depender das condições reacionais, tais como estruturas do tipo gaiola, do tipo escada ou aleatórias, conforme demonstrado na Figura 12:

Figura 12 – Representação estrutural dos silsesquioxanos.



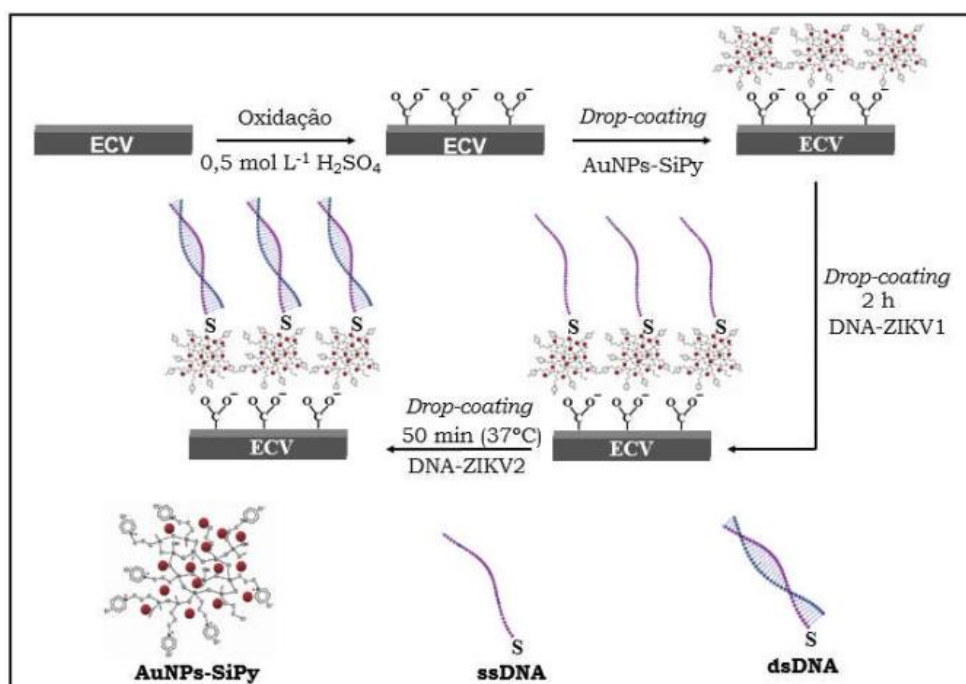
Fonte: Adaptado de Kaneko, 2018.

A estrutura de sílica-oxigênio atua como um estabilizante para os diversos materiais e, além disso, polieletrólitos silsesquioxanos apresentam cargas positivas em suas estruturas poliméricas, por essa razão, há um crescente interesse na síntese de nanocompósitos a partir de silsesquioxanos (Kickelbick, 2014; Steinmetz *et al.*, 2019). Diversos trabalhos relatados na literatura demonstram a potencialidade desses materiais em serem empregados tanto como agentes estabilizantes na síntese de MNPs, visando obter nanocompósitos mais estáveis e evitar a coalescência (Steinmetz *et al.*, 2019), quanto na formação de filmes finos para a incorporação em sensores e biossensores.

Lima *et al.* (2022) desenvolveram um biossensor modificado com AuNPs estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano ($\text{SiAMPy}^+\text{Cl}^-$) para a detecção de biomarcadores da doença de Chagas. O nanoconjugado desenvolvido foi denominado $\text{AuNPs-SiAMPy}^+\text{Cl}^-$, demonstrou boa estabilidade ($\zeta = +58,6$ mV) e as AuNPs apresentaram um diâmetro médio de 5,8 nm, ocasionando um aumento significativo na sensibilidade do biossensor, além de não apresentar citotoxicidade em células sanguíneas.

Um biossensor voltamétrico para a detecção de catecol foi desenvolvido por Mossanha *et al.* (2017) a partir de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com AuNPs estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-). As AuNPs sintetizadas apresentaram tamanho médio de 5,0 nm e boa estabilidade ($\zeta = +38,5$ mV), contribuindo para aprimorar a atividade eletrocatalítica do biossensor, que apresentou LOD de $0,852 \mu\text{mol L}^{-1}$ e alta sensibilidade. Ainda utilizando o polieletrólito SiPy^+Cl^- , um biossensor impedimétrico de DNA *label-free* foi desenvolvido por Steinmetz *et al.* (2019) para detecção do Zika Vírus (ZIKV). A plataforma, construída a partir de um ECV modificado com AuNPs estabilizadas em SiPy^+Cl^- sobre o qual foi imobilizada uma sonda de ssDNA do ZIKV (Figura 13), demonstrou ser estável e foi capaz de detectar ZIKV em amostras reais com um LOD de $0,82 \text{ pmol L}^{-1}$ pela técnica de EIE.

Figura 13 – Representação esquemática das etapas de preparação de um biossensor para detecção do ZIKV.



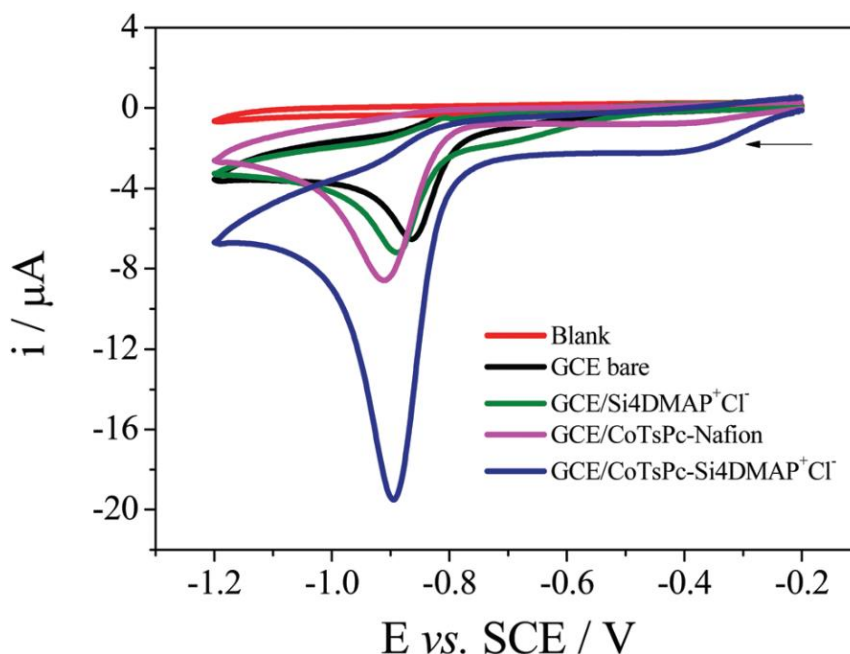
Fonte: Adaptado de Steinmetz *et al.*, 2019.

Winiarski *et al.* (2017) realizaram a detecção e a quantificação de sulfito em amostras de vinho branco e água de coco a partir de eletrodos de pasta de carbono (EPC) modificados com AuNPs estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil(4-metilpiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$). O diâmetro médio obtido para a suspensão foi de 45 nm e a incorporação do material na construção do eletrodo contribuiu para o aumento da condutividade e da atividade eletrocatalítica. Posteriormente, Crocomo *et al.* (2019) sintetizaram um polímero silsesquioxano iônico inédito o qual foi empregado na modificação de um sensor para a

detecção do biomarcador 4-nitrofenol, um composto potencialmente carcinogênico, teratogênico e mutagênico. O nitrato de 3-*n*-propil(4-metilpiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4Pic}^+\text{NO}_3^-$) foi sintetizado a partir do silsesquioxano $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ e aplicado como estabilizante na síntese de AgNPs, as quais apresentaram um diâmetro de 3,75 nm e foram incorporadas na superfície de um ECV. O dispositivo foi aplicado para a detecção do biomarcador 4-nitrofenol pelas técnicas de VC e EIE, apresentando um LOD de $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Outro silsesquioxano iônico também inédito foi sintetizado por Winiarski *et al.* (2020) e incorporado no desenvolvimento de um sensor capaz de realizar a detecção simultânea do medicamento anti-hipertensivo nifedipina (NIF) e do seu metabólito (dHNIF). A plataforma consistiu em um ECV modificado com o silsesquioxano iônico cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilaminopiridínio) ($\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$) com o objetivo de formar um filme sobre o qual foi imobilizada a ftalocianina tetrassulfonada de cobalto (II) (CoTsPc) e o seu desempenho na detecção do NIF em relação a outras plataformas é demonstrado na Figura 14. O sensor apresentou um LOD de $6,2 \text{ nmol L}^{-1}$ para o NIF e $4,5 \text{ nmol L}^{-1}$ para o metabólito dHNIF em uma faixa linear de $0,015$ a $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para $65 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NIF (pH 8,0) empregando quatro diferentes arquiteturas para o eletrodo: ECV branco; ECV/ $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$; ECV/ CoTsPc -Nafion e ECV/ CoTsPc - $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$.



Fonte: Winiarski *et al.*, 2020.

A síntese de MNPs e nanocompósitos estabilizados em materiais silsesquioxanos tem possibilitado a obtenção de nanopartículas bastante pequenas e estáveis, conforme observado

nos trabalhos aqui citados. Em relação aos silsesquioxanos iônicos, devido a presença de cargas em sua superfície, eles podem contribuir com efeitos eletrostáticos de estabilização, reduzindo ainda mais a agregação das nanopartículas. Adicionalmente, tem sido observado que a utilização conjunta dos silsesquioxanos com as nanopartículas proporciona um incremento significativo da resposta dos dispositivos eletroquímicos. A partir disso, entende-se que é promissora a incorporação de AuNPs estabilizadas em materiais silsesquioxanos no desenvolvimento de biossensores para detecção de miRNAs, a fim de obter dispositivos mais sensíveis, estáveis e biocompatíveis.

A nosso conhecimento, até o presente momento não foram reportados na literatura biossensores modificados com AuNPs estabilizadas em polímeros silsesquioxanos para a detecção de miRNAs específicos para a Doença de Alzheimer, assim como não foram reportadas sínteses de AuNPs tendo como estabilizante o polímero silsesquioxano $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$. Dessa maneira, buscando contribuir com o diagnóstico da DA e estimando reduzir algumas das lacunas existentes, este trabalho propõe a detecção eletroquímica dos miRNAs 29a e 34a a partir de uma plataforma de ECV modificada com AuNPs estabilizadas no polímero silsesquioxano iônico $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico modificado com AuNPs estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetil-aminopiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$) tendo como foco o diagnóstico rápido, precoce e de baixo custo para a Doença de Alzheimer a partir de microRNAs circulantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o material híbrido cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilaminopiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$) a partir da funcionalização do xerogel com o pró-ligante 4-DMAP;
- Sintetizar nanopartículas de ouro estabilizadas em $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ para posterior modificação de ECVs;
- Caracterizar o nanohíbrido sintetizado por técnicas espectroscópicas (UV-Vis e FTIR) e por técnicas microscópicas (MEV-FEG e MET);
- Modificar um eletrodo de carbono vítreo (ECV) utilizando o nanohíbrido AuNPs- $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ sintetizado;
- Caracterizar o ECV modificado com o nanohíbrido por técnicas eletroquímicas de Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE);
- Estudar a otimização da imobilização das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a na superfície do eletrodo modificado com o nanohíbrido empregando técnicas eletroquímicas como VOQ e EIE;
- Construir a curva analítica para detecção de diferentes concentrações dos miRNAs 29a e 34a;
- Aplicar o biossensor desenvolvido para a detecção dos miRNAs 29a e 34a como potenciais biomarcadores da doença de Alzheimer, por meio da realização de determinações *in vitro* dos mesmos em amostras de fluidos biológicos, como soro sanguíneo, utilizando-se de técnicas eletroquímicas como VOQ e EIE.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4) e fosfato de sódio bibásico (NaH_2PO_4) utilizados para o preparo do tampão fosfato (PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline*) foram adquiridos da marca Biosynth. Ferrocianeto de potássio trihidratado ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ácido tetracloroaúrico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e albumina sérica bovina (BSA) pela empresa Sigma-Aldrich. 4-(dimetilamino)piridina (4-DMAP) obtido pela empresa Merck. Todas as soluções foram preparadas com água de alta pureza (Milli-Q).

Os miRNAs e anti-miRNAs utilizados foram sintetizados pela empresa Genone Biotechnologies, dos quais: (i) sonda do anti-miRNA-29a tiolada na extremidade 5' com a sequência 5'-C6-SH/TAACCGATTTCAGATGGTGCTA/3'; (ii) oligonucleotídeo alvo livre de enxofre e complementar ao anti-miRNA-29a 5'---/TAGCACCATCTGAAATCGGTTA/3'; (iii) sonda do anti-miRNA-34a tiolada na extremidade 5' com a sequência 5'-C6-SH/ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3' e (iv) oligonucleotídeo alvo livre de enxofre e complementar ao anti-miR-34a 5'- TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'. As soluções contendo as sequências foram preparadas em parceria pelo Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG (LABMOM) e após o preparo permaneceram armazenadas em temperatura de -20°C . O xerogel empregado na síntese do silsesquioxano $\text{Si}_4\text{DMAP}^+\text{Cl}^-$ foi cedido pelo Dr. João Paulo Winiarski do grupo AMPERE – Laboratório de Plataformas Eletroquímicas da UFSC, o qual foi obtido conforme procedimento de síntese relatada na literatura (Winiarski *et al.* 2020).

As sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a foram obtidas com a modificação tiol na extremidade 5' para favorecer a incorporação das mesmas na superfície do eletrodo através da ligação covalente com as AuNPs do nanohíbrido $\text{AuNPs-Si}_4\text{DMAP}^+\text{Cl}^-$. As sequências das sondas e alvos estão descritas conforme apresentado na Tabela 3:

Tabela 3 – Sequências de miRNA empregadas nas etapas de construção do biossensor, sendo elas como sondas o anti-miRNA-29a e o anti-miRNA-34a e como alvos o miRNA-29a e o miRNA-34a, respectivamente.

(continua)

Sequências de miRNA		
Sonda	anti-miRNA-29a	5'-C6-SH/TAACCGATTTCAGATGGTGCTA-3'
Alvo	miRNA-29a	5'- TAGCACCATCTGAAATCGGTTA-3'

Tabela 3 – Sequências de miRNA empregadas nas etapas de construção do biossensor, sendo elas como sondas o anti-miRNA-29a e o anti-miRNA-34a e como alvos o miRNA-29a e o miRNA-34a, respectivamente.

(conclusão)

Sequências de miRNA		
Sonda	anti-miRNA-34a	5'-C6-SH/ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3'
Alvo	miRNA-34a	5'- TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'

Fonte: A autora.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As medidas de DLS e Potencial Zeta foram obtidas no equipamento MALVERN ZETASIZER NANO, software Zetasizer. As espectroscopias de FTIR e UV-Vis foram realizadas em espectrofotômetros SHIMADZU (modelo IRPrestige-21) e Varian (modelo Cary 50), respectivamente, e as análises de MEV-FEG no equipamento Tescan (modelo Mira3). Todos os equipamentos acima citados estão disponibilizados no Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-LABMU-UEPG).

As imagens de MET foram obtidas em parceria com IMA-UFRJ utilizando o equipamento JEOL 2100F. As medidas eletroquímicas de Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EOQ) realizadas com potenciostato modelo MULTI-AUTOLAB M204 conectado a um computador com o *software* Nova 2.1.6 para exibição e análise dos resultados, ambos equipamentos disponibilizados no GDEM.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Síntese do Si4DMAP⁺Cl⁻

A síntese do silsesquioxano cloreto de 3-*n*-propil(4-dimetilaminopiridínio) silsesquioxano (Si4DMAP⁺Cl⁻) foi realizada a partir da organofuncionalização do xerogel com o 4-(dimetilamino)piridina (4-DMAP) com base no procedimento elaborado por Winiarski *et al.* (2020). Em um balão de fundo redondo contendo uma solução preparada com 80 mL de tolueno e 1,6 g de 4-DMAP foram adicionados 4,0 g de xerogel e a mistura foi mantida em refluxo na temperatura do solvente durante 24 h em constante agitação mecânica. Após esse período, retirou-se o sobrenadante da solução e foram realizadas lavagens do sólido com 50 mL de etanol ultrapuro uma vez ao dia durante 6 dias. Por fim, o solvente foi removido por

rotaevaporação a 65°C e o sólido ($\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$) branco foi retirado do balão e mantido em dessecador.

4.3.2 Síntese de AuNPs estabilizadas em $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$

Com base em metodologias já adotadas pelo grupo de pesquisa, a síntese das AuNPs estabilizadas no polímero silsesquioxano $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ seguiu a metodologia empregada por Lima *et al.* (2022). O procedimento de síntese foi realizado a partir de 2,0 mL das soluções de $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ (2 gL⁻¹) como agente estabilizante e do $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol L⁻¹) como precursor metálico, acrescidos do mesmo volume de NaBH_4 (4,5 mmol L⁻¹) como agente redutor. Em primeiro momento, realizou-se a mistura do agente estabilizante e do precursor metálico mantendo-os em agitação magnética constante e banho de gelo, em seguida adicionou-se o agente redutor gota a gota durante os primeiros 30 min, totalizando 4 h de síntese. Observou-se a mudança de coloração da solução de amarelo para vermelho escuro, evidenciando a formação das AuNPs. O nanohíbrido sintetizado foi denominado AuNPs- $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, caracterizado e mantido sob refrigeração.

4.3.3 Caracterização dos silsesquioxano $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e do nanohíbrido AuNPs- $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$

As estruturas do $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e do nanohíbrido AuNPs- $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ foram caracterizadas pelas técnicas de DLS, Potencial Zeta, Espectroscopias UV-Vis e de FTIR. As análises de Potencial Zeta e DLS desses materiais foram realizadas em temperatura ambiente, com amostras dispersas em meio aquoso e nas mesmas concentrações utilizadas para a modificação do ECV.

Os espectros de FTIR foram realizados na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹ em modo transmitância, na resolução de 4 cm⁻¹ e por 64 *scans* com as amostras gotejadas em brometo de potássio (KBr), o qual foi misturado e seco para a formar as pastilhas utilizadas na análise. Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos a partir de soluções 1:10 preparadas em meio aquoso, sendo as medidas realizadas em cubeta de quartzo na faixa de 200 a 800 nm.

Foram realizadas também caracterizações por técnicas de imagem de MEV-FEG para obtenção de imagens da superfície do ECV modificado com AuNPs- $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e do ECV modificado somente pelo $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ para verificar as alterações na estrutura após a incorporação das AuNPs. As medidas de MEV-FEG foram realizadas em plataformas de disco plástico contendo carbono vítreo no interior onde as amostras foram gotejadas e posteriormente metalizadas. O nanohíbrido foi também caracterizado pela técnica de MET para verificação da

morfologia e tamanho das AuNPs. Para realização da análise a amostra em suspensão foi depositada em grades de cobre 300 mesh revestidas com Formvar, posteriormente seca e observada em equipamento JEOL 2100F operado a 200 kV. Por meio da análise das imagens obtidas, foi estimado o tamanho médio das AuNPs pelo *software* Image-J.

4.3.4 Construção do biossensor de miRNA modificado com AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻

Para a construção do biossensor, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida utilizando uma malha para polimento metalográfico e suspensões de alumina com as granulometrias de 1,0, 0,5 e 0,3 μm . Após o polimento, o mesmo foi lavado com água destilada e mantido em dessecador para a secagem. O nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ foi empregado na modificação da superfície do ECV pela técnica *drop-coating*, gotejando-se o volume de 5,0 μL e permanecendo 40 min para secagem completa em dessecador, obtendo o ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻.

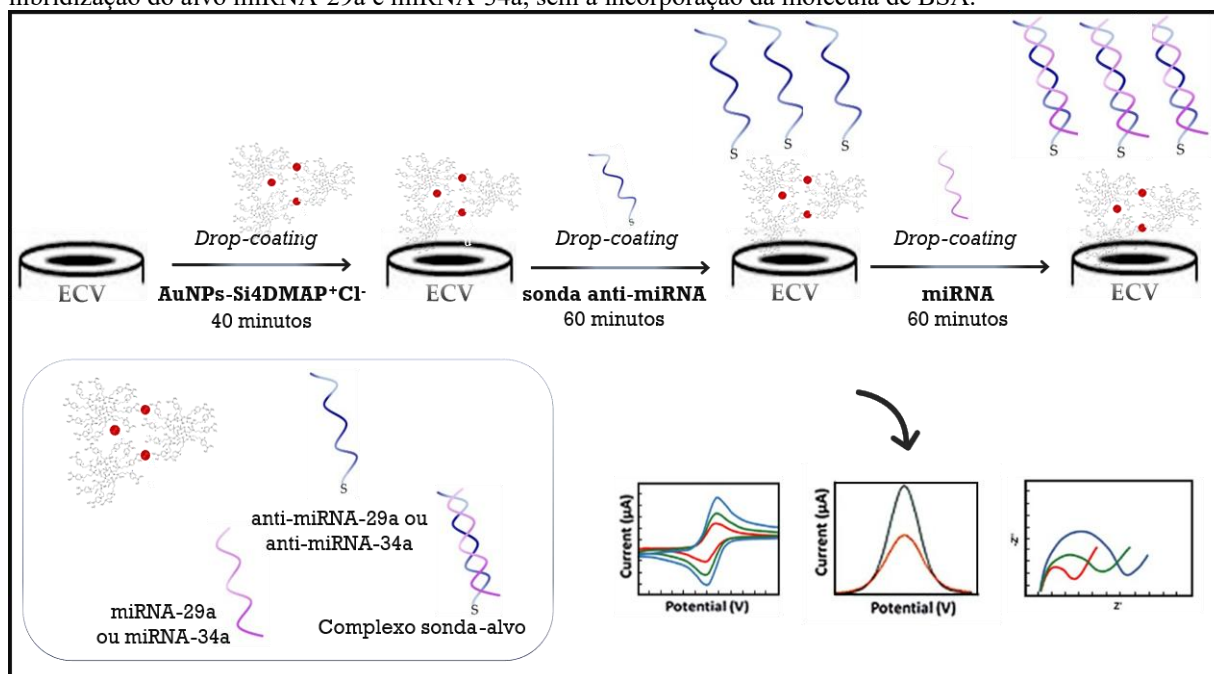
Após a modificação da superfície do eletrodo, realizou-se a imobilização da sonda anti-miRNA-29a e da sonda anti-miRNA-34a (100 pmol L^{-1}) adicionando-as por *drop-coating* nas superfícies modificadas de dois ECVs distintos, as quais permaneceram durante 25 minutos em câmara úmida para ocorrer a formação da ligação covalente entre tiol-Au. Posteriormente as superfícies dos ECVs foram imersas em tampão PBS para a retirada de oligonucleotídeos não adsorvidos, obtendo-se o ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a. Sequencialmente, os respectivos alvos miRNA-29a e miRNA-34a foram gotejados nas superfícies dos ECVs para realizar a hibridização das sondas com os alvos, os quais permaneceram durante 50 minutos em câmara úmida, e então as superfícies do ECVs foram imersas novamente em tampão PBS para a realização das medidas eletroquímicas dos ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a/miRNA-34a.

Para a construção da curva analítica e para as análises de detecção em amostra real, a fim de evitar a ocorrência de ligações não específicas na superfície do eletrodo, incorporou-se por gotejamento uma solução 1% de albumina sérica bovina (BSA) durante 30 minutos entre a etapa de imobilização dos anti-miRNAs e a hibridização com os alvos miRNAs.

A Figura 15 ilustra as etapas empregadas na construção do biossensor até a fase de hibridização com os alvos miRNA-29a e miRNA-34a. Optou-se pela síntese e incorporação do nanohíbrido para realizar a modificação do biossensor em decorrência principalmente da interação existente entre as AuNPs presentes no material e as sequências de anti-miRNA

modificadas com grupamentos tiol, resultando em uma ligação química estável proveniente da afinidade entre o Au-S.

Figura 15 - Representação esquemática das etapas empregadas na construção do biossensor até a fase de hibridização do alvo miRNA-29a e miRNA-34a, sem a incorporação da molécula de BSA.



Fonte: A autora.

4.3.5 Estudo de otimização do biossensor para o miRNA-29a modificado com AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻

Foram realizados estudos de otimização da plataforma a fim de obter os melhores valores para a concentração das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a e do tempo de imobilização das sondas, individualmente, na superfície do ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻. Inicialmente foi realizado um planejamento univariado buscando estimar os melhores valores de concentração das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a e, a partir dos valores obtidos, realizou-se o planejamento 2³ com triplicata no ponto central a fim de avaliar a influência da concentração das sondas e do tempo de incubação da sonda no processo de hibridização.

Os valores empregados nas variáveis para ambos os miRNAs podem ser observados na Tabela 4:

Tabela 4 - Valores dos níveis empregados na otimização do biossensor para os biossensores ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a via planejamento fatorial 2³.

(continua)			
Variável	(-)	(0)	(+)
[anti-miR-29a] (pmol μL^{-1})	5	10	15
Tempo _{inc} (minutos)	25	50	75

Tabela 4 – Valores dos níveis empregados na otimização do biossensor para os biossensores ECV/AuNPs-Si4DMAP+Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP+Cl⁻/anti-miRNA-34a via planejamento fatorial 2³.

Variável	(conclusão)		
	(-)	(0)	(+)
[anti-miR-34a] (pmol μL^{-1})	1	5	10
Tempo _{inc} (minutos)	25	50	75

Fonte: A autora.

Para o planejamento 2³ realizaram-se medidas de EIE com um valor fixo de 10 pmol μL^{-1} para a concentração dos alvos miRNA-29a e miRNA-34a e 50 min para o tempo de hibridização. A partir dos valores obtidos na variação percentual da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}) avaliou-se a melhor variável, empregando-se a seguinte equação para a obtenção dos valores de ΔR_{ct} :

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(hib)} - R_{ct(bios)}}{R_{ct(bios)}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

onde $R_{ct(bios)}$ é referente ao valor de R_{ct} obtido após a incubação, antes de ocorrer a hibridização, e $R_{ct(hib)}$ referente ao valor obtido após a hibridização. As variáveis que obtiveram os melhores valores de ΔR_{ct} , para cada um dos miRNAs separadamente, foram empregadas na modificação dos ECVs para a construção da curva analítica e nas análises de amostra real.

4.3.6 Curva analítica e análises em amostra real

A variação da concentração dos miRNAs alvo 29a e 34a foi analisada pela técnica de EIE com amostras nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 pmol μL^{-1} obtidas por diluição seriada. A construção da curva analítica foi realizada a partir da razão dos valores de ΔR_{ct} resultantes. A ocorrência da hibridização também foi avaliada pelo cálculo de $\Delta_{razão}$, descrito por Bonanni e del Valle (2010), empregado a fim de obter os valores de variação para cada concentração após a construção de uma nova plataforma, de acordo com a equação 3:

$$\Delta_{razão} = \frac{\Delta s}{\Delta p} \quad (3)$$

onde $\Delta s = R_{ct(bios)} - R_{ct(branco)}$ e $\Delta p = R_{ct(hib)} - R_{ct(branco)}$, de modo que $R_{ct(branco)}$ refere-se ao valor obtido para o eletrodo após a modificação com o nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻. Deste modo, consideram-se as variações relativas observadas nos valores de R_{ct} após a

renovação da plataforma em cada nova análise realizada, decorrentes da alta sensibilidade da técnica.

As análises em amostra real foram realizadas com amostras de soro sanguíneo previamente descongeladas e enriquecidas com 50 e 10 pmol μL^{-1} dos miRNAs 29a e 34a. A fim de evitar interferências nas análises causadas por variações na viscosidade, o enriquecimento das amostras com os miRNAs e o preparo da amostra sem a presença dos oligonucleotídeos foram realizados mantendo as mesmas proporções soro/solução de miRNAs de 1:1, de modo que a solução contendo os miRNAs foi substituída por água ultrapura neste último caso.

4.3.7 Medidas eletroquímicas

As etapas de caracterização do ECV e de construção do biossensor foram realizadas pelas técnicas: voltametria cíclica na faixa de -0,3 a -0,9 V; voltametria de onda quadrada (VOQ) na faixa de -0,2 V a 1,0 V, amplitude 0,02 V e frequência de 25 Hz; espectroscopia de impedância eletroquímica na faixa de frequência 20 kHz a 100 mHz com circuito equivalente de Randles $[R(Q[RW])]$. Todas as técnicas foram realizadas utilizando uma célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} na presença da sonda eletroquímica $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} como eletrólito de suporte. Observou-se em cada etapa as variações nas correntes de pico (i_p), correntes de pico anódico (i_{pa}) e pico catódico (i_{pc}), variações de potencial e variações nos valores de R_{ct} .

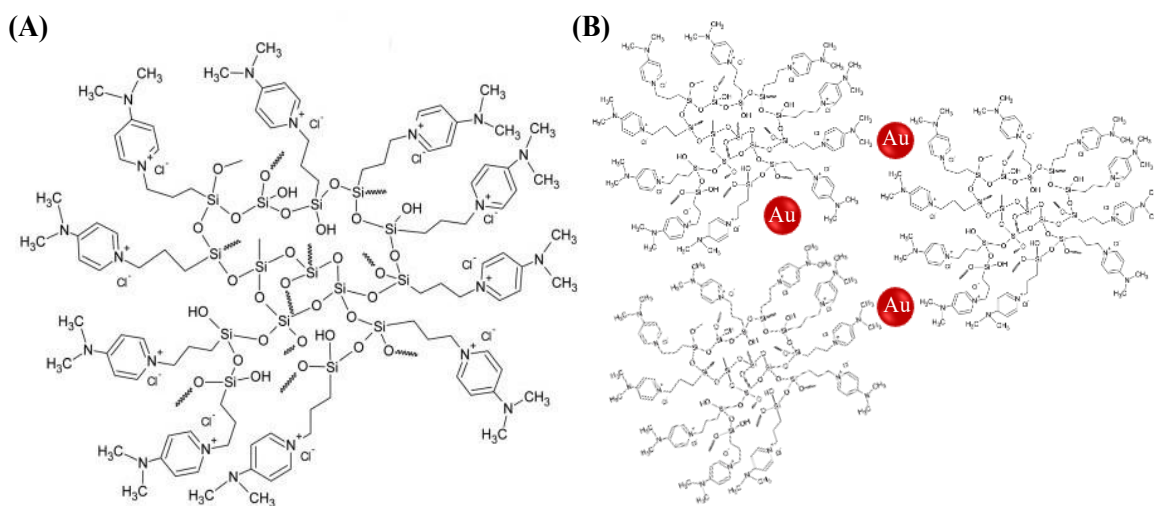
A célula eletroquímica utilizada consiste em um sistema convencional de três eletrodos, sendo eles: um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar, um eletrodo de Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência e um ECV modificado ou não como eletrodo de trabalho, de modo que no modificado foram incorporadas as $\text{AuNPs-Si}_4\text{DMAP}^+\text{Cl}^-$. Foram utilizados dois ECVs, sendo um para cada sequência de miRNA. Na construção do biossensor, as etapas de imobilização das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a, seguidas do acréscimo da solução de BSA 1%, e de hibridização com os alvos miRNA-29a e miRNA-34a, respectivamente, foram avaliadas por medidas eletroquímicas com a superfície dos ECVs úmidas após o enxágue com tampão PBS 0,1 mol L^{-1} em temperatura ambiente de 25 °C. Este enxágue é realizado a fim de descartar o excedente de sequências não imobilizadas, assim, considera-se que somente foram detectados os anti-miRNAs e miRNAs imobilizados na superfície do eletrodo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ E $\text{AuNPs-Si4DMP}^+\text{Cl}^-$

É relatado na literatura que a 4-(dimetilamino)piridina (4-DMP) é um composto eficiente na estabilização de nanopartículas metálicas, incluindo nanocristais e nanopartículas de ouro de tamanhos reduzidos e estáveis (Danger *et al.*, 2012; Gandubert; Lennox, 2005). Quando incorporada na matriz do silsesquioxano, pode oferecer propriedades ainda mais interessantes de estabilização para a síntese de AuNPs. A síntese de nanopartículas estabilizadas em silsesquioxanos é relatada na literatura desde 2012 (Dos Santos *et al.*, 2012; De Menezes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012) e, desde a síntese do $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$, não há relatos da obtenção de AuNPs em sua estrutura. Assume-se que, após formadas, as AuNPs são envolvidas e estabilizam-se na estrutura polimérica desordenada do $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ (Figura 16-a), combinando efeitos eletrostáticos e estéricos de estabilização, impedindo a coalescência. A estrutura sugerida para o nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ é apresentada na Figura 16-b.

Figura 16 – (A) Estrutura do cloreto de 3-n-propil(4-dimetilaminopiridínio) silsesquioxano ($\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$) e (B) estrutura sugerida para o nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMP}^+\text{Cl}^-$.

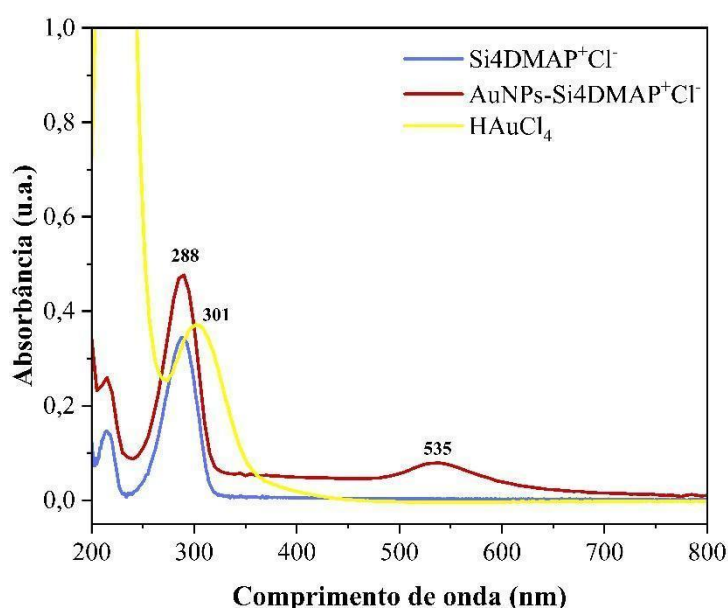


Fonte: (A) Adaptado de Winiarski *et al.*, 2020. (B) A autora.

Sabe-se que as soluções coloidais de metais nobres possuem colorações específicas relacionadas às suas propriedades ópticas e um dos efeitos que podem ser observados é a ressonância de plasmônica de superfície (SPR), um fenômeno que ocasiona uma oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução promovida pela incidência dos fótons sobre o material. A frequência de ressonância da SPR é bastante sensível a alguns fatores como, por

exemplo, às propriedades dielétricas do meio, ao tamanho e ao formato das nanopartículas (Amendola *et al.*, 2017; Ghosh; Pal, 2007; Saha *et al.*, 2012). De modo a caracterizar essa banda, foram obtidos espectros de absorção na região do UV-Visível do nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ (Figura 17), comparando-os com os espectros do polímero silsesquioxano Si4DMAP⁺Cl⁻ e do sal de ouro HAuCl₄. No espectro obtido para AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ atribuiu-se a presença do efeito de SPR das AuNPs na banda observada em 535 nm. Também pode ser observada a ausência da banda do HAuCl₄ na faixa de 301 nm, relativa à transferência de carga metal-ligante (Mossanha et al., 2017), constatando a obtenção das nanopartículas pela redução do AuCl₄⁻ para Au⁰. No espectro do Si4DMAP⁺Cl⁻ observa-se uma banda na região do ultravioleta em 288 nm referente à transição π - π^* do anel piridínico (Winiarski *et al.*, 2020) a qual também foi observada no espectro do nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ (288 nm) demonstrando que essa banda não sofreu deslocamento com a incorporação das AuNPs.

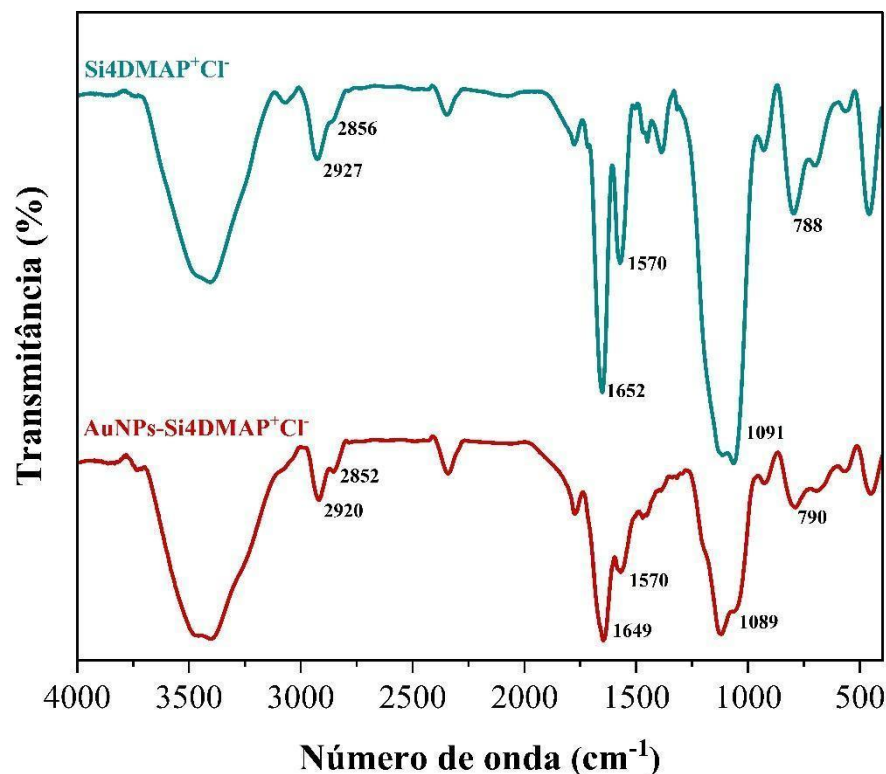
Figura 17 - Espectros de absorção na região do UV-Vis para as dispersões de AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, Si4DMAP⁺Cl⁻ e HAuCl₄ obtidas na faixa de 200 a 800 nm.



Fonte: A autora.

De modo a verificar a obtenção do silsesquioxano Si4DMAP⁺Cl⁻ pela organofuncionalização com o 4-DMAP, assim como observar as alterações em sua estrutura após a incorporação das AuNPs, ambos os materiais (Si4DMAP⁺Cl⁻ e AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻) foram caracterizados pela técnica de FTIR (Figura 18) e os valores em número de onda atribuídos para os modos vibracionais observados nos espectros são apresentados na Tabela 5:

Figura 18 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para o material Si4DMAP⁺Cl⁻ e o nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ obtidos em KBr.



Fonte: A autora.

Tabela 5 - Valores em número de onda para a região do infravermelho e os respectivos modos vibracionais das bandas observadas nos espectros do material Si4DMAP⁺Cl⁻ e do nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ obtidos em KBr e comparados com os valores encontrados na literatura.

Modos Vibracionais	Número de onda (cm ⁻¹)			Referências
	Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	Ref.	
$\nu_{as}(C_{sp^3}-H)$	2927	2920	2960	(SUNDARAGANESAN <i>et al.</i> , 2008)
$\nu_s(C_{sp^3}-H)$	2856	2852	2846	
$\nu(C=C)$	1652	1649	1651	(WINIARSKI <i>et al.</i> , 2020)
$\nu(C=N)$	1570	1570	1570	(WINIARSKI <i>et al.</i> , 2020)
$\nu_{as}(Si-O-Si)$	1091	1089	1028	(WINIARSKI <i>et al.</i> , 2020)
$\nu_s(Si-O-Si)$	788	790	768	(CALAÇA <i>et al.</i> , 2017)

* ν = estiramento; as = assimétrico; s = simétrico.

Fonte: A autora.

No espectro obtido para o Si4DMAP⁺Cl⁻ as bandas em 2927 e 2856 cm⁻¹, atribuídas aos estiramentos assimétricos e simétricos da ligação $\nu(C_{sp^3}-H)$ referentes aos grupos metil, bem como as bandas referentes aos estiramentos $\nu(C=C)$ em 1652 cm⁻¹ e $\nu(C=N)$ em 1570 cm⁻¹, comprovam a funcionalização do silsesquioxano com o 4-DMAP (Winiarski *et al.*, 2020).

Esses conjuntos de bandas aparecem pouco deslocadas, em 2920 e 2852 cm^{-1} e em 1649 e 1570 cm^{-1} , no espectro obtido para o AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻. Além disso, as bandas associadas aos estiramentos assimétricos e simétricos do grupo Si-O-Si em 1091 e 788 cm^{-1} , respectivamente, no espectro do Si4DMAP⁺Cl⁻, surgem em 1089 e 790 cm^{-1} , e em menores intensidades no espectro do AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻. Essas modificações possivelmente são ocasionadas pela interação entre Au e Si-O-Si, resultando em alterações nos modos vibracionais do polieletrólito decorrentes da imobilização das AuNPs, conforme observado em outros trabalhos envolvendo a síntese de AuNPs estabilizadas em polímeros silsesquioxanos iônicos (Calaça *et al.*, 2017; Mossanha *et al.*, 2017).

A fim de verificar o tamanho hidrodinâmico das AuNPs sintetizadas, bem como a estabilidade da suspensão coloidal, foram realizadas análises de Potencial Zeta (ζ) e DLS. (Tabela 6). Tanto as AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ como Si4DMAP⁺Cl⁻ apresentaram valores Potenciais Zeta positivos, +43,0 e + 34,0 mV, respectivamente, o que era esperado devido à presença de grupos piridínicos presentes na estrutura do Si4DMAP⁺Cl⁻. Isto evidencia o caráter catiônico do silsesquioxano e a adequada imobilização das AuNPs em sua estrutura, efeito já retratado na literatura para a síntese de AuNPs estabilizadas nessa classe de materiais (Lima *et al.*, 2022; Zahrebelnei *et al.*, 2025)

Adicionalmente, pelo valor de ζ estar acima da faixa considerada típica de suspensões instáveis, a qual é entre -30,0 a +30,0 mV (Bhattacharjee, 2016), o nanohíbrido revelou boa estabilidade. Em relação aos valores obtidos na análise de DLS das AuNPs estabilizadas em Si4DMAP⁺Cl⁻ (66,4 nm) indica que o raio hidrodinâmico médio das AuNPs encontra-se dentro da faixa retratada pela literatura (Amendola *et al.*, 2017; Ghosh; Pal, 2007).

Tabela 6 – Valores de Potencial Zeta (ζ) e DLS referentes ao Si4DMAP⁺Cl⁻ e ao nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻.

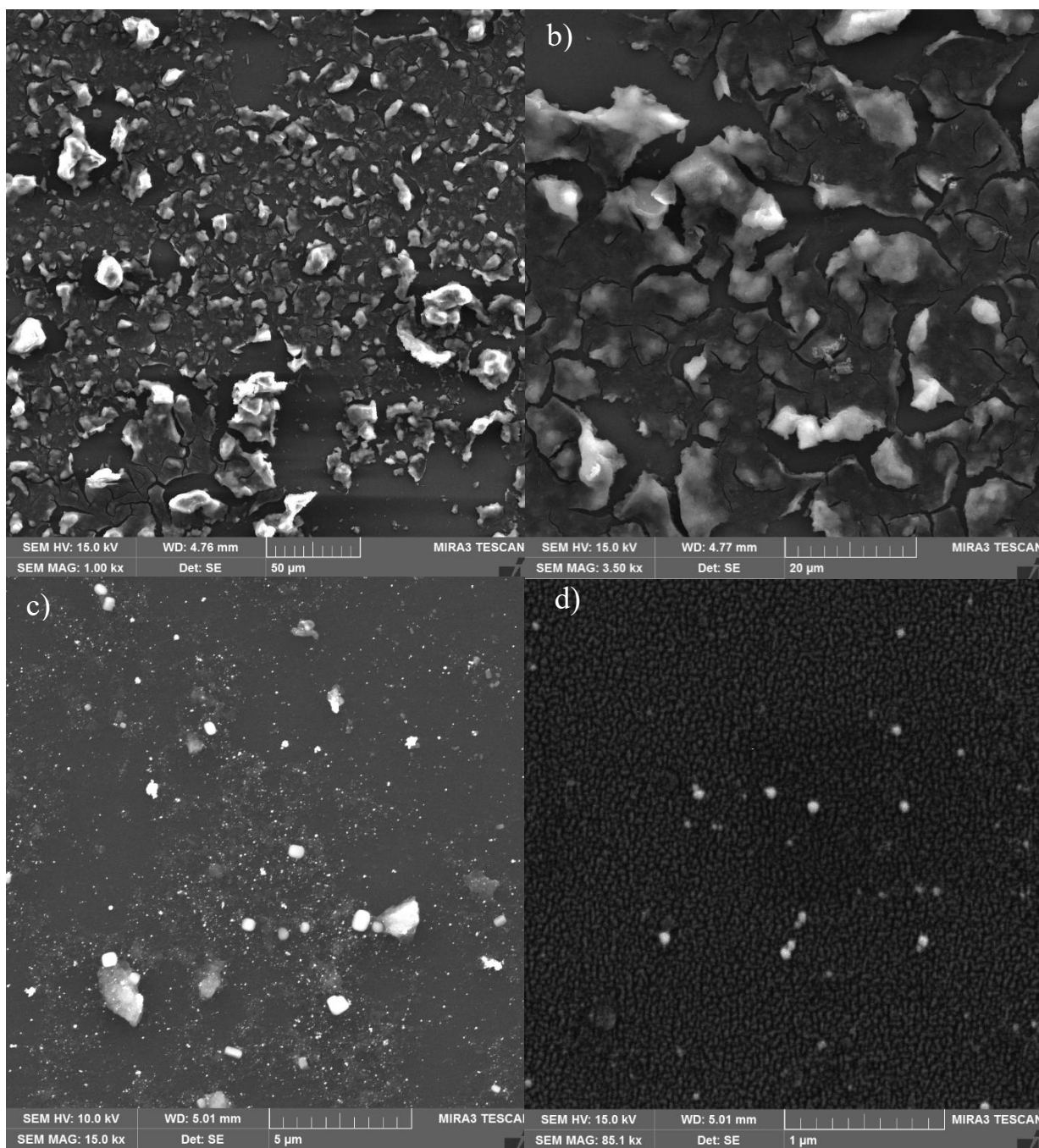
Material	Potencial Zeta (mV)	DLS (nm)
Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	+34,0	348,7
AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	+43,0	66,4

Fonte: A autora.

O material Si4DMAP⁺Cl⁻ e o nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ foram caracterizados por análises microscópicas de MEV-FEG (Figura 19) na superfície de um carbono vítreo modificado conforme os mesmos procedimentos realizados para as etapas de caracterização do ECV e da construção do biossensor. Nas imagens obtidas para o Si4DMAP⁺Cl⁻ (Figuras 19a e 19b) observa-se a presença de uma superfície rugosa distribuída por toda a superfície, enquanto

que nas imagens obtidas para o nanohíbrido (Figuras 19c e 19d) é possível visualizar a presença de agregados (*clusters*) em alguns pontos e um maior volume de partículas menores distribuídas por toda a superfície de carbono vítreo, as quais podem ser atribuídas às nanopartículas metálicas.

Figura 19 – Imagens de MEV-FEG obtidas em diferentes aproximações para o Si4DMAP⁺Cl⁻ em (a) e (b) e para o nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ em (c) e (d).

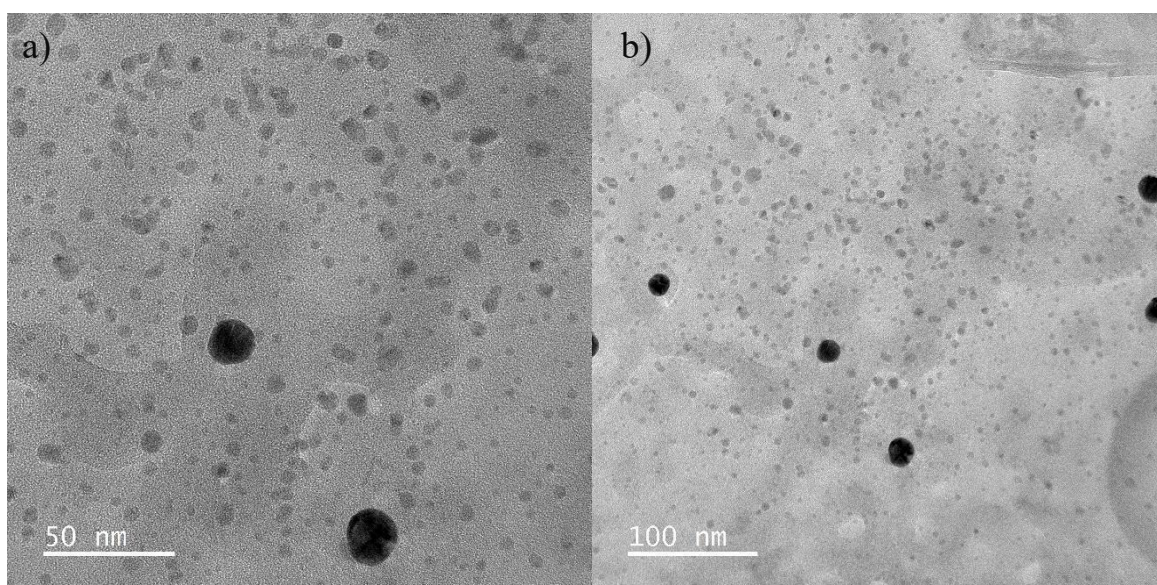


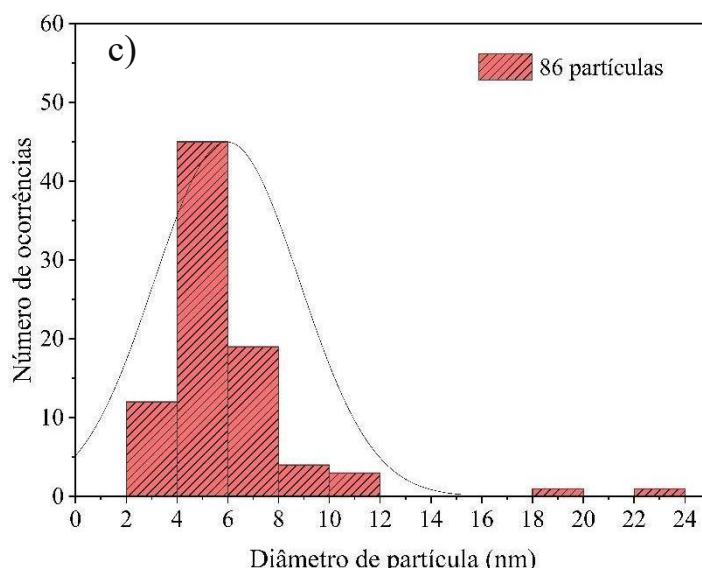
Fonte: A autora

Para uma melhor visualização das AuNPs, o nanohíbrido também foi caracterizado pela análise microscópica de MET (Figura 20) a fim de verificar o diâmetro e a morfologia das

mesmas. Realizou-se a contagem de 86 partículas a partir de uma das imagens obtidas pela técnica de MET (Figura 20-b) utilizando o *software* ImageJ, a partir da qual obteve-se a distribuição de tamanho de partículas mostrada na Figura 20-c. Nota-se, a partir das imagens, que as nanopartículas apresentam tamanho esférico e que o diâmetro médio obtido pela contagem de partículas foi de 6 nm, diâmetro muito inferior ao tamanho médio observado na análise de DLS. Essa diferença ocorre pois o DLS fornece o raio hidrodinâmico das AuNPs, onde se somam as camadas de água e também do estabilizante $\text{Si}_4\text{DMAP}^+\text{Cl}^-$, enquanto a técnica de MET é baseada em quanto do feixe de elétrons incidido sobre a amostra é transmitido (Bhattacharjee, 2016), possibilitando a obtenção de um tamanho mais próximo do real das AuNPs.

Figura 20 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) obtidas para AuNPs- $\text{Si}_4\text{DMAP}^+\text{Cl}^-$ para as diferentes aproximações a) 100 nm, b) 50 nm e c) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs obtidos a partir da imagem de MET com a contagem de 86 partículas.





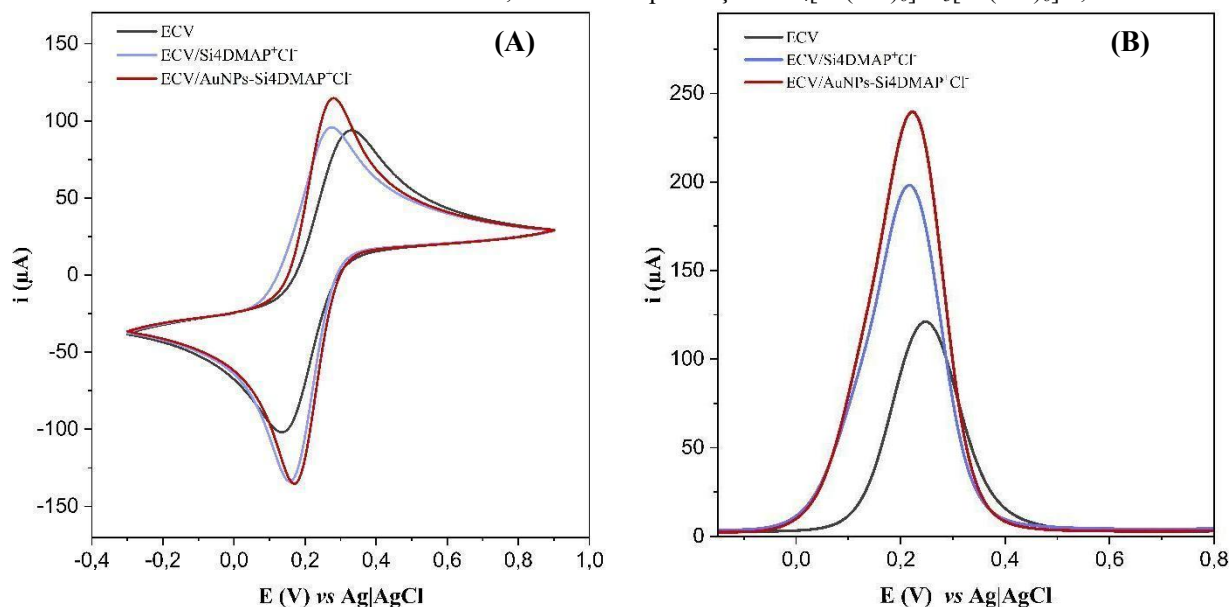
Fonte: A autora.

5.1.1 Caracterização eletroquímica dos materiais $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ e $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ na modificação do ECV

Com o propósito de observar o desempenho das AuNPs na melhora da resposta eletroquímica, foram realizadas as caracterizações eletroquímicas para o ECV sem modificação, para o ECV modificado somente com o silsesquioxano $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ (ECV/ $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$), e do ECV modificado com o nanohíbrido (ECV/ $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$). Em cada etapa de modificação dos ECVs foram realizadas as técnicas de VC, VOQ e EIE em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença da sonda eletroquímica com processo redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a fim de comparar a resposta dos mesmos em cada uma das três técnicas utilizadas. Em todos os voltamogramas cíclicos obtidos (Figura 21a) são observados apenas um processo redox reversível referente ao par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ com o envolvimento de 1 elétron. Nos demais voltamogramas (Figura 21a) e a partir dos valores dos parâmetros eletroquímicos (Tabela 7) nota-se que a incorporação do nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ na superfície do ECV resulta em valores um pouco mais elevados de corrente de pico anódico (I_{pa}) ($114,6 \mu\text{A}$) e corrente de pico catódico (I_{pc}) ($-135,2 \mu\text{A}$) em comparação com o ECV sem modificação ($I_{\text{pa}} = 94,1 \mu\text{A}$ e $I_{\text{pc}} = -101,9 \mu\text{A}$) e também do ECV/ $\text{Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ ($I_{\text{pa}} = 95,7 \mu\text{A}$ e $I_{\text{pc}} = -133,5 \mu\text{A}$), ainda que este último tenha também ocasionado um grande aumento no valor de I_{pc} . Também foi possível observar que o ECV/ $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$ foi o que obteve o menor valor de diferença de potencial (ΔE_p) quando comparado aos demais eletrodos. Esses resultados podem ser atribuídos à incorporação das AuNPs pela excelente atividade eletrocatalítica que estas desempenham (Mossanha *et al.*, 2017; Saha *et al.*, 2012),

ressaltando a capacidade do nanohíbrido em auxiliar nos processos de oxidação e redução. Além disso, o deslocamento ocasionado em ambos os potenciais de pico (E_{pa} e E_{pc}) demonstra que essa superfície facilita o processo de transferência de elétrons (Steinmetz *et al.*, 2019).

Figura 21 - (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura 100 mV s^{-1}) e (B) voltamogramas de onda quadrada (faixa de $-0,2 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V}$, amplitude $0,02 \text{ V}$ e frequência de 25 Hz) para ECV, ECV/Si4DMAP⁺Cl⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ obtidos em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Tabela 7 – Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 13a para os eletrodos ECV, ECV/Si4DMAP⁺Cl⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻.

ELETRODO	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)
ECV	94,1	-101,9	0,33	0,13	0,20
ECV/Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	95,7	-133,5	0,27	0,15	0,12
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	114,6	-135,2	0,28	0,17	0,11

Fonte: A autora.

Corroborando o que foi observado nos voltamogramas obtidos por VC, os resultados obtidos por VOQ (Figura 21b) evidenciam ainda mais claramente o aumento nos valores de corrente de pico (Tabela 8) proporcionado pela incorporação tanto do polímero inorgânico, quanto do nanohíbrido. Isto porque na VOQ há menos influência da corrente capacitiva. O aumento no valor de I_p ocasionado pela inserção do Si4DMAP⁺Cl⁻ no ECV é notável (63,7%) pois se trata de um material com cargas positivas distribuídas em sua estrutura, as quais proporcionam um aumento da interação eletrostática com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ carregada negativamente. Já para o ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ o aumento na corrente é de 97,9% em relação ao ECV não modificado e essa mudança pode ser atribuída,

além da interação eletrostática, à presença das AuNPs no material que favorecem a interação das espécies eletroativas com a superfície do eletrodo (Bonanni; Del Valle, 2010) ocasionando o aumento da resposta eletroquímica em decorrência das características já citadas.

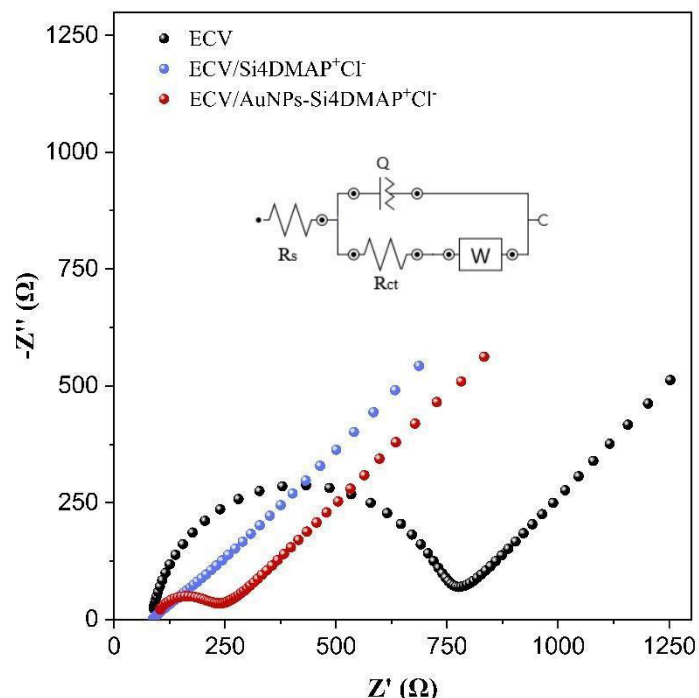
Tabela 8 – Valores de potencial e corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 21b para ECV, ECV/Si4DMAP⁺Cl⁻, ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻.

ELETRODO	I _p (μA)	E _p (V)
ECV	121,0	0,25
ECV/Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	198,1	0,22
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	239,5	0,22

Fonte: A autora.

Na EIE o parâmetro de R_{ct} avalia a resistência à transferência de carga na interface entre a superfície do eletrodo e a solução. Nos diagramas de Nyquist obtidos pelas análises realizadas por EIE (Figura 22) é possível observar duas regiões, sendo uma linear onde os íons sofrem um processo difusional e uma região semicircular onde o processo é limitado por transferência de elétrons (Huang; Zhu; Kianfar, 2021; Steinmetz *et al.*, 2019). Constatou-se que o ECV sem modificação apresentou um alto valor de R_{ct} que diminuiu significativamente de 657 Ω para 382 Ω após a incorporação do Si4DMAP⁺Cl⁻. Essa mudança pode ser atribuída à atração entre as cargas positivas presentes na estrutura do material com as cargas negativas da solução de [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻. A incorporação do polímero inorgânico na superfície do ECV ocasiona uma forte atração eletrostática que atrai as espécies carregadas negativamente, uma vez que ele possui cargas positivas em sua estrutura, favorecendo a transferência de elétrons e por consequência diminuindo o valor de R_{ct} .

Figura 22 - Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para ECV, ECV/Si4DMAP⁺Cl⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ em PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na faixa de 20 kHz a 100 mHz.



Fonte: A autora.

Tabela 9 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{ct}) e resistência da solução (R_s) obtidos pela técnica de EIE referentes aos diagramas de Nyquist da Figura 22 para os eletrodos ECV, ECV/Si4DMAP⁺Cl⁻ e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻.

ELETRODO	R_{ct} (Ω)	R_s (Ω)
ECV	657	85
ECV/Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	382	86
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	159	85

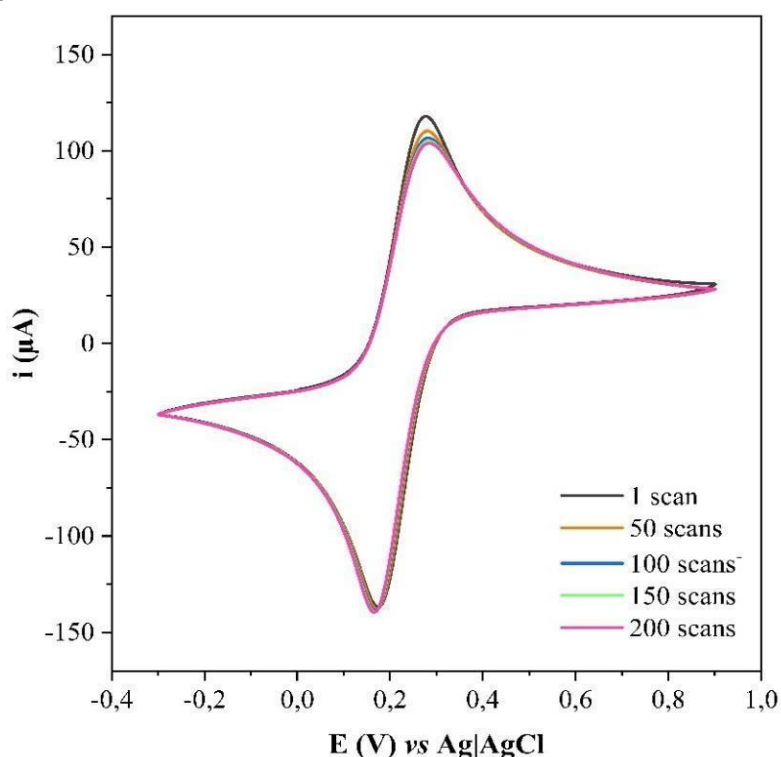
Fonte: A autora.

A presença de ambos os materiais, Si4DMAP⁺Cl⁻ e AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, favorecem significativamente o processo de transferência de carga, ocasionando grande redução nos valores de R_{ct} quando comparados ao ECV sem modificação. Entretanto, um declínio muito mais significativo no valor de R_{ct} é observado após a modificação do ECV com o nanohíbrido, o qual diminui de 657 Ω para 159 Ω este é incorporado na superfície eletródica (tabela 9), decorrente dos processos de eletrocatalise favorecidos pelo material. Assim, salienta-se que a incorporação das AuNPs na construção do biossensor é necessária tanto para favorecer os processos eletroquímicos, evidenciada pelos maiores valores de corrente obtidos na presença do nanohíbrido em relação ao Si4DMAP⁺Cl⁻, assim como para a incorporação dos

oligonucleotídeos. O intuito é que ocorra a imobilização da sonda anti-miRNA-29a na superfície do ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ partir da formação da ligação tiol-Au (Huang; Zhu; Kianfar, 2021; Steinmetz *et al.*, 2019).

Foram realizados estudos a partir da técnica de VC para monitorar a estabilidade do ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ com a realização de 200 varreduras. Observa-se a partir dos voltamogramas obtidos (Figura 23) que não houve variação significativa nos valores de potencial de pico e de I_{pc} , apenas uma redução consideravelmente pequena nos valores de I_{pa} , presumivelmente em decorrência de lixiviação do material ou devido à incorporação da sonda redox na superfície do ECV. Pode-se considerar que a ocorrência dessa perda do nanohíbrido da superfície eletródica foi pouco expressiva visto que não foram utilizadas técnicas adicionais visando a sua ancoragem e que o tempo empregado na realização das medidas eletroquímicas é significativamente menor do que o tempo em que a plataforma ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ permaneceu imersa na solução durante a realização das 200 varreduras. Além disso, o decréscimo se estabiliza após os primeiros ciclos.

Figura 23 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ a fim de monitorar a estabilidade do mesmo após a realização de 200 varreduras de potencial em PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ (velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹).

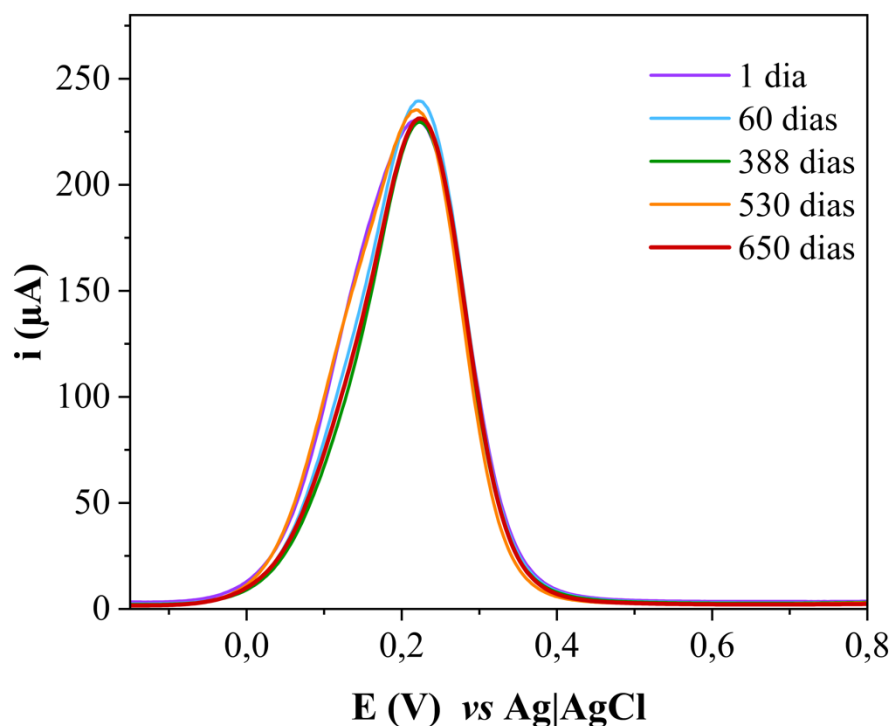


Fonte: A autora.

A estabilidade da resposta eletroquímica do nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ foi monitorada ao longo dos meses a partir das técnicas de VOQ. Para cada um dos dias em que foram

realizadas as análises foi necessária a limpeza do eletrodo e a construção de uma nova plataforma, seguida da realização das medidas. Na Figura 24 são apresentados os voltamogramas obtidos desde o primeiro dia, a contar da obtenção do nanohíbrido, até o dia 650.

Figura 24 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ monitorado no intervalo de 650 dias a partir da data de sua síntese (faixa de -0,2 V a 1,0 V, amplitude 0,02 V e frequência de 25 Hz).



Fonte: A autora.

Constatou-se que o nanohíbrido manteve a estabilidade eletroquímica ao longo dos meses, uma vez que os valores obtidos se mantiveram dentro da faixa observada nos primeiros dias após a obtenção do material e a mudança dos valores de I_p foi pouco significativa no decorrer dos dias, conforme demonstrado na Tabela 10, sendo observada uma variação máxima de 10 μA apenas, além de não haver alteração nos valores de E_p . Observa-se que os valores de I_p obtidos em todas as análises são muito superiores em comparação com o ECV sem modificação com o nanohíbrido ($I_p = 121,0 \mu\text{A}$), demonstrando não ter ocorrido perda significativa do sinal eletroquímico ao longo de 650 dias. Isso pode ser atribuído a excelente estabilização das AuNPs na matriz do silsesquioxano, impedindo a sua coalescência.

Tabela 10 – Valores de potencial e corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 24 para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ do dia 1 ao dia 650.

(continua)

DIA	I_p (μA)	E_p (V)
1	230,4	0,22
60	239,5	0,22

Tabela 10 – Valores de potencial e corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 24 para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ do dia 1 ao dia 650.

(conclusão)		
DIA	Ip (μA)	Ep (V)
388	229,5	0,22
530	235,2	0,22
650	231,3	0,22

Fonte: A autora.

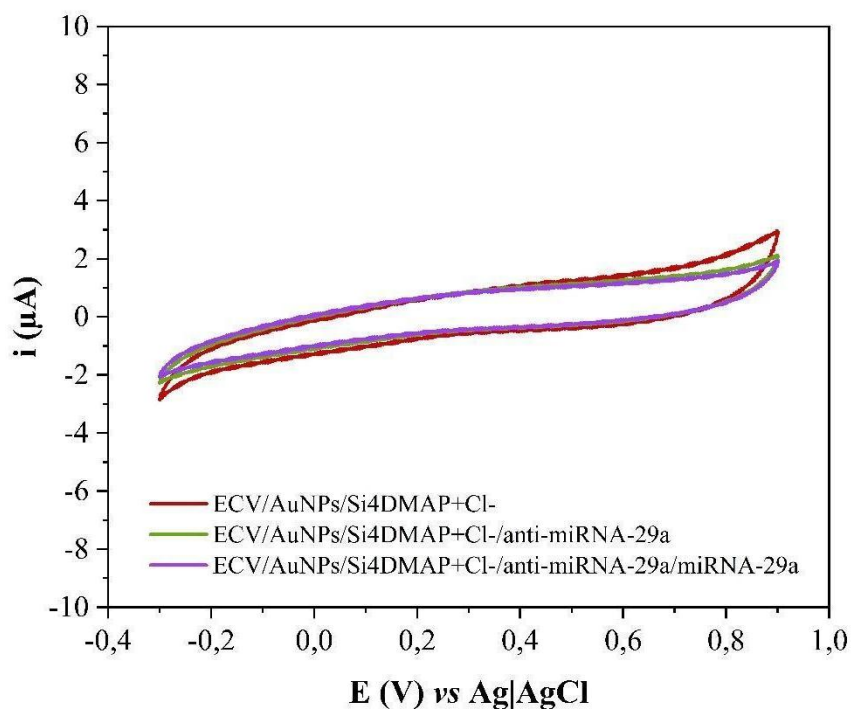
O nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ demonstrou boa estabilidade durante o período consideravelmente longo e contribuiu significativamente na melhora da resposta eletroquímica, conforme observado. Tais resultados indicam o potencial da plataforma proposta em contribuir com o aumento da sensibilidade no desenvolvimento de biossensores, possibilitando uma superfície favorável para a funcionalização com biomoléculas, favorecendo a sua imobilização. A fim de avaliar essa aplicação, selecionou-se o miRNA-29a para realização da próxima etapa.

5.1.2 Caracterização eletroquímica do biossensor de miRNA modificado com AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻

As etapas de construção do biossensor a partir dos ECVs modificados com AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ foram caracterizadas pelas técnicas de VC, VOQ e EIE a fim de verificar a ocorrência da imobilização da sonda anti-miR-29a (anti-miRNA-29) na superfície do ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ e a detecção do alvo miR-29a (miRNA-29a) pela hibridização sonda-alvo. A efetivação de cada uma dessas etapas pode ser observada pelos decréscimos nos valores Ip_a, Ip_c e Ip obtidos pelas técnicas de VC e VOQ, bem como pelo aumento de R_{ct} na técnica de EIE.

Uma análise inicial de VC foi realizada alterando-se o eletrólito de suporte para tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ com o intuito de averiguar o comportamento do nanohíbrido e da presença das biomoléculas nas etapas de imobilização e hibridização na ausência do marcador redox. Os voltamogramas obtidos são demonstrados na Figura 25.

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos do ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a em PBS 0,1 mol L⁻¹ obtidos a velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.



Fonte: A autora.

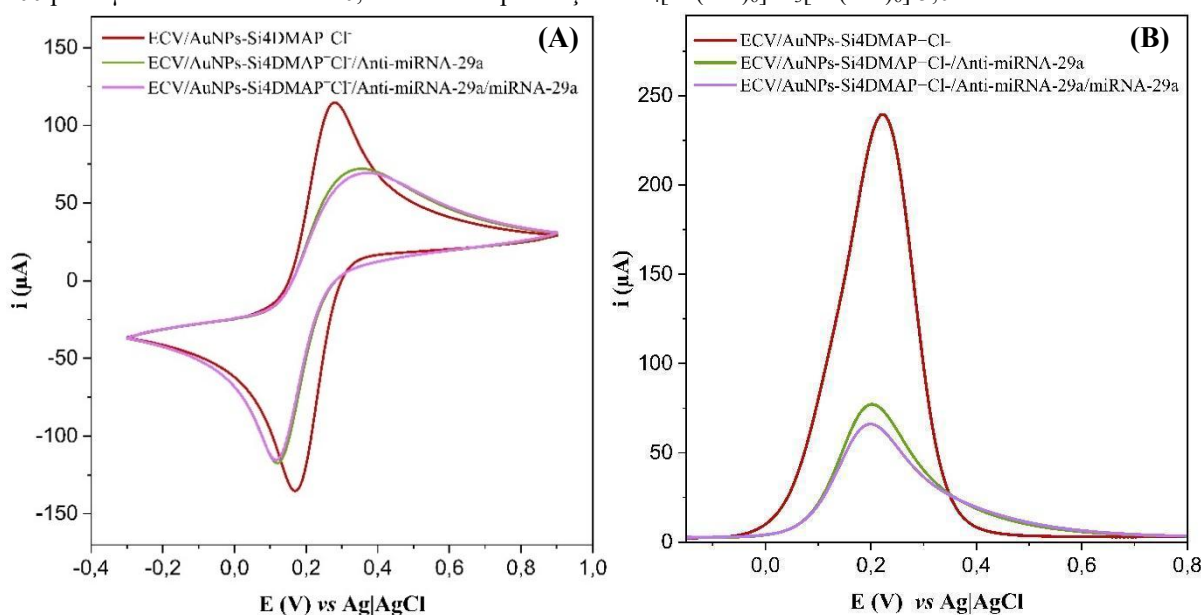
Na ausência da sonda redox é possível observar somente a influência da corrente capacitiva para todos os eletrodos, portanto, as etapas seguintes de caracterização do biossensor e construção da curva analítica foram realizadas na presença do marcador redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de modo a verificar as alterações no processo de transferência de elétrons a medida em que as biomoléculas são incorporadas na superfície do ECV.

Nos voltamogramas obtidos por VC (Figura 26a) são constatados valores elevados de I_{p_a} e I_{p_c} (Tabela 11) obtidos com a incorporação do nanohíbrido AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ na superfície do ECV. Após a imobilização da biomolécula, a presença da sonda anti-miRNA-29a na superfície do eletrodo dificulta o processo de transferência de carga ao repelir a sonda eletroativa, ocasionando deslocamento dos potenciais para valores mais positivos, diminuição no valor de I_{p_c} e um decréscimo ainda mais expressivo no valor de I_{p_a} . Essa diminuição é decorrente da repulsão eletrostática entre os grupos fosfato de carga negativa presentes na estrutura do anti-miRNA-29a com a sonda redox de carga negativa. Além da diminuição da corrente, observa-se também que ocorre um aumento significativo no valor de ΔE_p em relação ao ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻ após a imobilização da sonda.

Com a hibridização do alvo miRNA-29a a 100 pmol μL^{-1} observa-se um maior decréscimo da corrente de pico de oxidação, uma vez que este está diretamente relacionado

com a concentração de oligonucleotídeos na superfície do eletrodo, o que ocasiona um impedimento para a transferência de elétrons. Além disso, a técnica de VC sofre maior influência da corrente capacitiva. Entretanto, a variação observada ainda é pequena, resultado que pode ser atribuído a uma elevada concentração da sonda, possivelmente ocorrendo a saturação da superfície com a inserção do alvo, ou à baixa concentração do alvo em relação à sonda.

Figura 26 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura 100 mV s^{-1}) e (B) voltamogramas de onda quadrada (faixa de $-0,2 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V}$, amplitude $0,02 \text{ V}$ e frequência de 25 Hz) para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a para $100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ de alvo em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Tabela 11 - Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 26a para os eletrodos 1- ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, 2- ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e 3- ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a.

ELETRODO	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)
1	114,6	-135,3	0,28	0,16	0,12
2	72	-117,3	0,35	0,11	0,24
3	68	-115,5	0,36	0,11	0,25

Fonte: A autora.

Os processos de imobilização da sonda e de hibridização também foram avaliados pela técnica de VOQ (Figura 26b). A diminuição no valor de I_p (Tabela 12) obtido na etapa de imobilização da sonda na superfície do ECV foi muito mais expressiva, assim como evidenciou-se a diminuição da corrente na etapa de hibridização sonda-alvo no voltamograma obtido por VOQ em comparação com as variações de I_{pa} e I_{pc} observadas por VC, isso se deve à maior

sensibilidade observada na técnica em decorrência da diminuição da corrente capacitiva e do aumento da corrente faradaica.

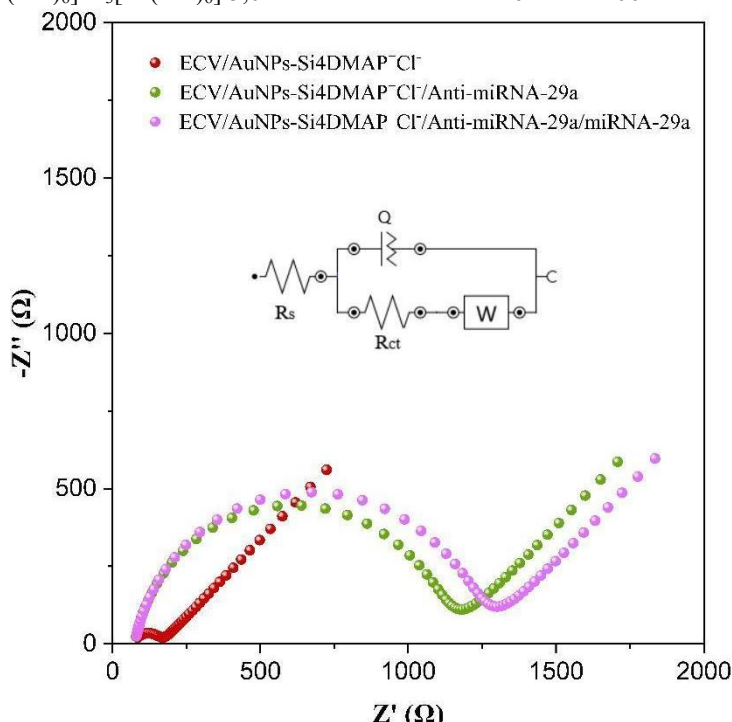
Tabela 12 – Valores de corrente e potencial de pico obtidos a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 26b para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miR-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miR-29a/miR-29a.

ELETRODO	I _p (μA)	E _p (V)
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	239,5	0,22
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a	77,2	0,20
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a/miR-29a	66,0	0,20

Fonte: A autora.

A partir da técnica de EIE (Figura 27) verificou-se que o ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a apresentou um aumento significativo nos valores de R_{ct} (Tabela 13) em relação à superfície do eletrodo modificado com o nanohíbrido, aumentando de 94 Ω para 1050 Ω, o que evidencia a efetivação da imobilização da sonda anti-miRNA-29a. A presença da sonda cria uma barreira que dificulta a passagem dos íons [Fe(CN)₆]^{3-/4-} presentes na solução para a superfície do eletrodo, dificultando o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Um aumento ainda maior no valor de R_{ct} é observado no ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a (1170 Ω), o qual pode ser atribuído a maior concentração de oligonucleotídeos imobilizados no ECV proporcionada hibridização da sonda-alvo, causando uma maior resistência para a transferência de elétrons.

Figura 27 – Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a em PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na faixa de 20 kHz a 100 mHz.



Fonte: A autora.

Tabela 13 – Valores de resistência de transferência de carga e resistência da solução obtidos a partir dos elementos utilizados no circuito equivalente pela técnica de EIE referentes aos diagramas de Nyquist da Figura 27 para os eletrodos 1) ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻; 2) ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/Anti-miRNA-29a e 3) ECV/AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻/Anti-miRNA-29a/miRNA-29a.

ELETRODO	R_{ct} (Ω)	R_s (Ω)
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻	94	71
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a	1050	75
ECV/AuNPs-Si4DMAP ⁺ Cl ⁻ /anti-miR-29a/ miR-29a	1170	75

Fonte: A autora.

Analisando os resultados obtidos para as três técnicas empregadas nos testes preliminares de imobilização da sonda anti-miRNA-29a e do alvo miRNA-29a, optou-se por seguir nos próximos testes com as técnicas de VOQ e EIE. Além disso, compreendeu-se necessária a otimização dos parâmetros de imobilização das sondas a fim de favorecer a hibridização sonda-alvo, etapa essencial para a obtenção de uma plataforma mais sensível.

5.1.3 Otimização do biossensor para detecção de miRNAs modificado com AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻

Na etapa de otimização, a concentração das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a e o tempo de imobilização foram avaliadas, sendo que o parâmetro empregado para verificar quais as melhores variáveis foi o de maior valor de ΔR_{ct} obtido após o processo de

hibridização da sonda com o alvo. Para cada um dos ensaios foi realizada a limpeza do eletrodo, seguida da montagem de uma nova plataforma.

O estudo das melhores condições de imobilização das sondas é de grande importância considerando-se a detecção das moléculas alvo é diretamente influenciada por fatores como a homogeneidade e a densidade da monocamada criada na superfície do ECV pela imobilização das fitas de anti-miRNA (Thapa *et al.*, 2022). Se a superfície já foi saturada com a presença das sondas, a sensibilidade para a detecção das moléculas alvo pode ser afetada em virtude da dificuldade destas em acessarem as sondas e efetivarem a hibridização.

O estudo de variação da concentração e do tempo de imobilização da sonda a fim de estabelecer as melhores condições experimentais para os dois anti-miRNAs selecionados foi realizada via planejamento fatorial 3^2 (Tabela 14), mantendo fixa a concentração dos respectivos alvos em $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$. Os valores para os ensaios foram selecionados conforme estudos univariados realizados previamente.

Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 utilizado para a otimização das variáveis envolvidas na etapa de montagem do biossensor. As variáveis estudadas foram: [anti-miRNA-29a] = 5 (-), 10 (0) e $15 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ (+); [anti-miRNA-34a] = 1 (-), 5 (0) e $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ (+); e Tempo_{inc} para ambos = 25 (-), 50 (0) e 75 min (+).

(continua)

ENSAIO	[anti-miRNA-29a]	Tempo _{inc}	ΔR_{ct} (%)
1	-	-	70,3
2	-	+	25,1
3	-	0	77,5
4	0	-	87,2
5	0	0	39,4
6	0	0	33,2
7	0	0	32,1
8	0	+	64,6
9	+	-	60,2
10	+	0	47,2
11	+	+	57,4

Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 utilizado para a otimização das variáveis envolvidas na etapa de montagem do biossensor. As variáveis estudadas foram: [anti-miRNA-29a] = 5 (-), 10 (0) e 15 pmol μL^{-1} (+); [anti-miRNA-34a] = 1 (-), 5 (0) e 10 pmol μL^{-1} (+); e Tempo_{inc} para ambos = 25 (-), 50 (0) e 75 min (+).

(conclusão)			
ENSAIO	[anti-miRNA-34a]	Tempo _{inc}	ΔRct (%)
1	-	-	118,1
2	-	+	98,5
3	-	0	74,7
4	0	-	94,5
5	0	0	41,6
6	0	0	41,5
7	0	0	37,3
8	0	+	60,7
9	+	-	122,6
10	+	0	75,7
11	+	+	46,0

Fonte: A autora.

Avaliando os resultados obtidos para os valores de ΔRct , observa-se que o maior tempo de imobilização das sondas não foi favorável para ambos os miRNAs, especialmente quando associadas ao aumento da concentração da sonda. O decaimento no valor de ΔRct quando aumentada a concentração das sondas pode ser associado com o excesso de volume de fitas dos anti-miRNAs imobilizadas na superfície do eletrodo, dificultando a hibridização com os respectivos alvos. Em relação ao aumento de tempo de hibridização, é possível que menores tempos favoreçam a formação de arranjos mais organizados e estáveis na superfície do ECV/AuNPs-Si4DMPA⁺Cl⁻.

Analisando os resultados conclui-se que o maior valor de ΔRct para ambos os miRNAs foi obtido nas condições [anti-miRNA-29a] e [anti-miRNA-34a] = 10 pmol μL^{-1} e Tempo_{inc} = 25 min, ainda que os níveis empregados para os planejamentos tenham sido distintos, em decorrência de estudos prévios realizados. A redução no tempo de imobilização é um ajuste vantajoso pensando em reduzir o tempo de preparo da plataforma. Assim, para a construção da curva analítica foram mantidos esses parâmetros, mantendo-se o tempo de hibridização em 50 min.

Para a construção da curva analítica e para as análises em amostra real observou-se a necessidade de bloquear os sítios não ligantes na superfície do ECV após a etapa de imobilização das sondas. Essa medida é empregada visando minimizar a adsorção não

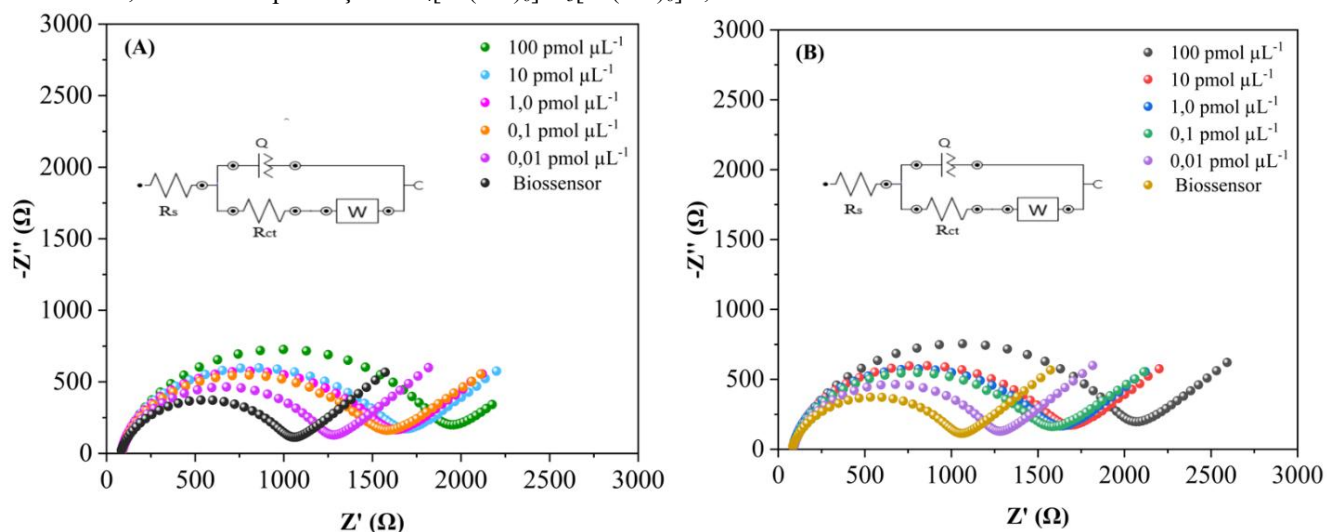
específica de moléculas na superfície do ECV modificado (Thapa *et al.*, 2022; Rashid; YUSOF, 2017) devido à presença das cargas positivas do nanohíbrido, o que poderia ocasionar a imobilização de moléculas em sítios não específicos devido à interação eletrostática, por exemplo. Assim, foram realizados testes prévios com MCH e BSA, duas moléculas amplamente retratadas na literatura como eficientes bloqueadores de sítios não específicos. O MCH não contribuiu para a reprodutibilidade da resposta eletroquímica obtida para as diferentes concentrações da curva analítica, portanto, diante do desempenho satisfatório da BSA a 1%, esta foi a molécula escolhida para a realização das próximas etapas.

A molécula de BSA, que apresenta carga negativa em pH acima de 4.4 (Beykal *et al.*, 2015), cria uma nova monocamada que impede que os miRNAs alvo, que também possuem cargas negativas provenientes dos grupos fosfato, sejam imobilizados diretamente na superfície do ECV por interação eletrostática em decorrência da afinidade com a carga positiva do AuNPs-Si4DMAP⁺Cl⁻, ligando-se apenas na fita correspondente. Desse modo, ocorre também uma limitação da interação de sequências não complementares, especialmente nos testes de amostra real, uma vez que não há tratamento prévio das amostras de soro sanguíneo e esta é uma matriz bastante complexa, contendo moléculas as quais poderiam interagir com o nanohíbrido.

5.2 Curva de detecção dos miRNAs 29a e 34a e cálculos de LOD e LOQ

A construção da curva analítica foi realizada a partir das condições otimizadas de imobilização dos anti-miRNAs 29a e 34a, acrescidas da molécula de BSA, mantendo-se fixo o tempo de hibridização dos alvos miRNAs ($\text{Tempo}_{\text{inc}} = 50 \text{ min}$) e variando-se a concentração dos mesmos por meio de diluições em água ultrapura. A faixa, apresentada na Tabela 15, iniciou-se pelos menores valores de [miRNA-29a] e [miRNA-34a] até atingir a maior concentração de $100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ para ambos e a resposta obtida para cada uma das variações foi analisada pelo ΔR_{ct} monitorado pelas medidas de EIE. A hibridização em diferentes concentrações também foi avaliada pela variação relativa nos valores de R_{ct} após a renovação do biossensor para cada variação de concentração, identificados por $\Delta_{\text{razão}}$ (conforme equação 3). Nessa análise, considera-se a ocorrência do processo de hibridização quando os valores resultantes são > 1 (Bonnani; Del Valle, 2010). Os valores obtidos para ambos os miRNAs estão descritos na Tabela 15:

Figura 28 - Diagramas de Nyquist obtidos a partir de EIE para (A) ECV/AuNPs-Si4DMP⁺Cl⁻/anti-miRNA-29a/miRNA-29a e (B) ECV/AuNPs-Si4DMP⁺Cl⁻/anti-miRNA-34a/miRNA-34a em diferentes concentrações. PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na faixa de 20 kHz a 100 mHz.



Fonte: A autora.

Tabela 15 – Valores médios de ΔR_{ct} e respectivos valores de desvio padrão obtidos em duplicata para o ensaio de detecção dos miRNAs 29a e 34a por EIE em diferentes concentrações.

[miRNA-29a] (pmol μL^{-1})	ΔR_{ct} (%)	Desvio padrão	$\Delta_{\text{razão}}$
0	0,34	0,321	1,01
0,01	24,82	0,533	1,29
0,1	40,09	0,369	1,44
1	52,26	0,145	1,59
10	61,96	2,469	1,72
100	80,37	0,261	1,90
[miRNA-34a] (pmol μL^{-1})	ΔR_{ct} (%)	Desvio padrão	$\Delta_{\text{razão}}$
0	1,10	0,844	1,01
0,01	25,48	0,171	1,30
0,1	42,04	0,881	1,45
1	56,22	0,085	1,62
10	74,80	3,51	1,85
100	81,41	1,170	1,94

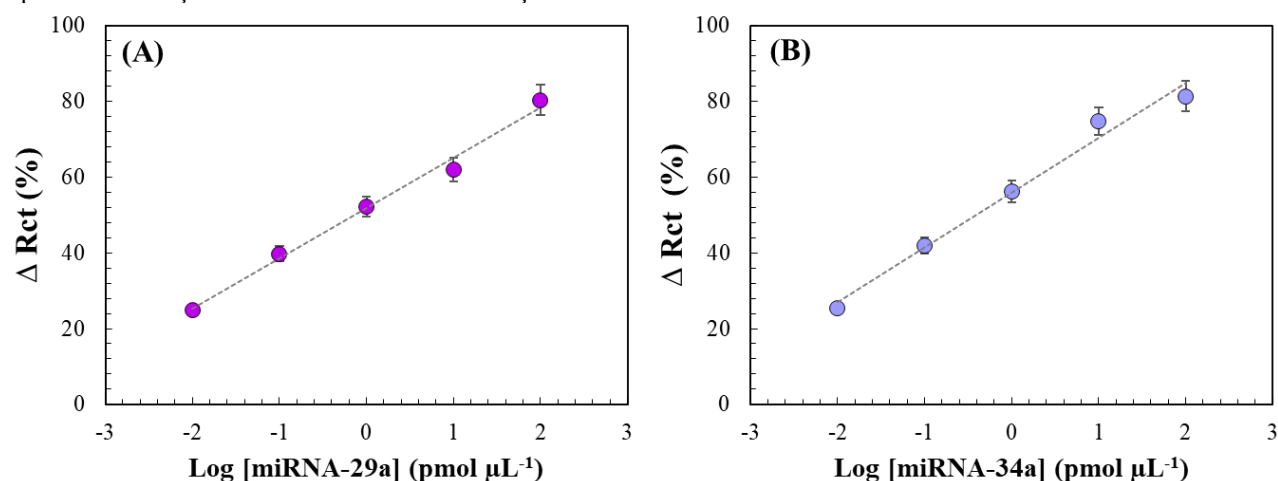
Fonte: A autora.

Para as amostras sem a presença dos miRNAs ([miRNA] = 0 pmol μL^{-1}) observa-se que a resistência à transferência de carga não sofre alterações significativas, demonstrado pelos valores médios de ΔR_{ct} próximos de 1 (Bonanni; Del Valle, 2010). Por outro lado, a medida em que as concentrações do miRNA-29a e do miRNA-34a aumentam, ocorre um aumento proporcional nos valores de médios de ΔR_{ct} . Esse aumento pode ser atribuído ao maior número

de moléculas alvo hibridizadas na superfície do ECV, criando uma maior barreira para a transferência de elétrons à medida que a concentração aumenta. O mesmo pode ser observado nos valores de $\Delta R_{\text{azão}}$, os quais aumentam proporcionalmente ao aumento da concentração, confirmando que mais moléculas de miRNA foram imobilizadas a cada aumento de concentração para ambos os miRNAs. Essa abordagem permite verificar que os valores de R_{ct} se mantiveram proporcionais mesmo após variações decorrentes da renovação da superfície do ECV com o nanohíbrido para cada uma das análises de monitoramento nas diferentes concentrações, demonstrando que a resposta da plataforma se mantém linear.

A partir dos valores médios de ΔR_{ct} obtidos construiu-se a curva analítica para o miRNA-29a e para o miRNA-34a, conforme demonstrado na Figura 29:

Figura 29 - Curvas analíticas obtidas com base nos valores médios de ΔR_{ct} apresentados na tabela 15 para (A) ECV/AuNPs-Si4DMAP+Cl-/anti-miRNA-29a/BSA e (B) ECV/AuNPs-Si4DMAP+Cl-/anti-miRNA-34a/BSA após a hibridização com as diferentes concentrações dos alvos.



Fonte: A autora.

Ao plotar os valores de ΔR_{ct} em função do logaritmo da concentração do miRNA-29a e do miRNA-34a, separadamente, obtém-se a correlação linear entre os pontos, resultando nas seguintes equações de regressão: $13,327 \log [\text{miRNA-29a}] + 51,84$ com $R = 0,9912$ para o miRNA-29a e $14,462 \log [\text{miRNA-34a}] + 55,99$ com $R = 0,9840$ para o miRNA-34a.

O biossensor foi capaz de detectar as variações na concentração dos miRNAs em uma faixa de de 0,01 a 100 pmol μL^{-1} , demonstrando a sensibilidade da plataforma. Este fato pode ser evidenciado pelo p-valor ($\cong 0,0006$) obtido na análise estatística de ANOVA, com nível de significância de 99%, tanto para o miRNA-29a, quanto para o miRNA-34a.

A partir dos resultados das curvas analíticas, calculou-se o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) para as plataformas desenvolvidas para ambos os miRNAs segundo as diretrizes da ANVISA (2017). O LOD representa a menor concentração que o

biossensor desenvolvido é capaz de detectar, mas não necessariamente quantificar, para o miRNA-29a e para o miRNA-34a, de modo que $LOD = 3,3 \times SD/b$, onde SD é referente ao desvio padrão e b é a inclinação da reta da curva analítica. Para o miRNA-29a o valor de LOD obtido foi $= \log 0,25354$ ou $LOD = 1,79 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ e para o miRNA-34a $= \log 0,34376$ ou $LOD = 2,21 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$. Em comparação com o trabalho encontrado na literatura para a detecção eletroquímica do miRNA-29a, o biossensor desenvolvido neste trabalho foi capaz de detectar uma concentração equiparavelmente baixa para este miRNA.

Também foram realizados os cálculos para obtenção dos valores de limite de quantificação (LOQ) para ambos os miRNAs a partir da equação $LOQ = 10 \times SD/b$, de modo que SD e b possuem os mesmos significados para o cálculo de LOD. O LOQ corresponde à menor concentração em que os miRNAs podem ser quantificados com exatidão pelos biossensores desenvolvidos, de modo que para o miRNA-29a obteve-se $LOQ = \log 0,7683$ ou $LOQ = 5,87$ e para o miRNA-34a $LOQ = \log 1,0417$ ou $LOQ = 11,01 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$.

Salienta-se que em todos os ensaios o dispositivo proposto foi construído utilizando pouquíssimo volume do nanohíbrido $\text{AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-$, das sondas anti-miRNA e dos alvos miRNAs, apenas $5,0 \mu\text{L}$ de cada amostra, além de que as sondas se mostraram eficientes na baixa concentração definida pelo planejamento ($[\text{anti-miR-29a}]$ e $[\text{anti-miR-34a}] = 10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$). Tais aspectos demonstram o uso econômico dos materiais empregados na modificação. Além disso, a construção da plataforma exige poucas etapas.

5.3 Testes preliminares de detecção dos miRNAs 29a e 34a em amostra real

Visando avaliar a sensibilidade dos biossensores $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-29a/BSA}$ e $\text{ECV/AuNPs-Si4DMAP}^+\text{Cl}^-/\text{anti-miRNA-34a/BSA}$ diante de uma matriz mais complexa, testes preliminares foram realizados também na detecção dos miRNAs 29a e 34a em amostras de soro sanguíneo humano enriquecido, nas concentrações de 0, 10 e $50 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$. Na Tabela 16 estão valores de ΔR_{ct} e I_p obtidos para as duas plataformas:

Tabela 16 – Valores de ΔR_{ct} e I_p obtidos nos ensaios de detecção em soro diluído dos miRNAs 29a e 34a por EIE em diferentes concentrações.

(continua)

Concentração do miRNA-29a ($\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$)	ΔR_{ct} (%)
0	38,27
10	44,12
50	48,74

Tabela 16 – Valores de ΔR_{ct} e I_p obtidos nos ensaios de detecção em soro diluído dos miRNAs 29a e 34a por EIE em diferentes concentrações.

(conclusão)

Concentração do miRNA-34a (pmol μL^{-1})	ΔR_{ct} (%)
0	35,5
10	36,7
50	61,6

Fonte: A autora.

A variação nos valores de ΔR_{ct} com o aumento da concentração dos miRNAs 29a e 34a demonstra que o biossensor foi capaz de distinguir entre as amostras de soro com e sem a presença dos alvos. Observa-se uma variação de 27,3% entre valores de ΔR_{ct} para as concentrações de 0 e 50 pmol μL^{-1} para miRNA-29a e de 73,5% para o miRNA-34a para as mesmas concentrações. Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento das moléculas alvo imobilizadas na superfície do ECV, dificultando o processo de transferência de elétrons. Ainda que seja necessária a realização de mais estudos, os resultados preliminares obtidos demonstram a potencialidade dos biossensores para aplicação na detecção de miRNAs em amostras biológicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilização de AuNPs em silsesquioxanos foram pela primeira vez sintetizadas em 2012 por nosso grupo (Dos Santos *et al.*, 2012) e do Prof. Dr. Benvenuti (De Menezes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012) e, desde a síntese do $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$, esse foi o primeiro trabalho que relata a incorporação de AuNPs em suas estruturas. O nanohíbrido sintetizado AuNPs- $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ apresentou boa estabilidade da suspensão ($\zeta = +43,0$) e tamanho nanométrico característico, com raio hidrodinâmico médio de 66,4 nm e tamanho médio de 6 nm obtido a partir da contagem de partículas. Também foi observada a sua estabilidade na realização de medidas eletroquímicas por um período maior do que 600 dias, evidenciando a contribuição do material silsesquioxano na estabilização das AuNPs, o qual evita a aglomeração das mesmas. A inserção do nanohíbrido na superfície do ECV proporcionou considerável aumento dos valores de I_{pa} , I_{pc} , I_p , diminuição nos valores de potencial e de R_{ct} . Esses resultados obtidos demonstram que o material contribuiu favoravelmente na resposta eletroquímica e nos processos de transferência de carga, bem como na eletrocatalise da reação do par redox da sonda eletroquímica empregada.

Constatou-se que a incorporação do nanohíbrido AuNPs- $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ foi eficiente para a imobilização das sondas anti-miRNA-29a e anti-miRNA-34a na superfície do ECV, fato esse explicado pela presença das AuNPs e das cargas positivas do silsesquioxano, as quais potencializam a interação com as biomoléculas. A constatação dessa eficiência deu-se pela diminuição de I_p e pelo aumento de R_{ct} observados pelas técnicas eletroquímicas de VOQ e EIE, respectivamente.

A presença de ambas as sondas nas superfícies dos biossensores, ECV/AuNPs- $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ /anti-miRNA-29a e ECV/AuNPs- $\text{Si4DMP}^+\text{Cl}^-$ /anti-miRNA-34a, foram fundamentais para efetivar a hibridização com os respectivos alvos miRNA-29a e miRNA-34a. Após as escolhas das condições otimizadas, como a concentração e o tempo de incubação das sondas, foram obtidos os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação de (LOQ) de 1,79 e 5,87 pmol μL^{-1} para o miRNA-29a e de 2,20 e 11,01 pmol μL^{-1} para o miRNA-34a, respectivamente.

Além das características apresentadas por esse biossensor, o ineditismo desse trabalho também merece ser destacado, pois até o momento não foram encontrados na literatura relatos do emprego desse nanohíbrido ou do polieletrólito na detecção eletroquímica de miRNAs associados a Doença de Alzheimer ou de quaisquer outros biomarcadores. Assim, demonstra-

se que há potencialidade de aplicação desse nanohíbrido no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico na detecção de miRNAs associados à DA em amostras de sangue.

7 PERSPECTIVAS

- Execução de mais estudos de otimização dos biossensores para a detecção dos miRNAs em amostras de soro sanguíneo;
- Execução de testes de seletividade frente a outros miRNAs em amostra;
- Miniaturização dos biossensores para a detecção e quantificação dos miRNAs 29a e 34a com a construção de eletrodos impressos;
- Desenvolvimento de dispositivos para a imobilização de outros anti-miRNAs associados à Doença de Alzheimer, visando um diagnóstico mais confiável da doença;
- Utilização do AuNPs-Si₄DMA⁺P⁺Cl⁻ para a imobilização de outros tipos de sondas para detecção de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e a Esclerose Lateral Amiotrófica.

REFERÊNCIAS

- AMENDOLA, V. *et al.* Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, p. 1-48, 2017.
- AZIMZADEH, M. *et al.* Early detection of Alzheimer's disease using a biosensor based on electrochemically-reduced graphene oxide and gold nanowires for the quantification of serum microRNA-137. **RSC Advances**, v. 7, p. 55709-55719, 2017.
- BARBAGALLO, C. *et al.* Specific Signatures of Serum miRNAs as Potential Biomarkers to Discriminate Clinically Similar Neurodegenerative and Vascular-Related Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, p. 531-546, 2020.
- BEYKAL, B. *et al.* Influence of surface charge on the rate, extent, and structure of adsorbed Bovine Serum Albumin to gold electrodes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 460, p. 321-328.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BONANNI, A.; DEL VALLE, M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.678, p.7-17, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017**. Validação de métodos analíticos, Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acesso em: 15 abr. 2025.
- CACABELOS, R.; CACABELOS, P.; TORRELLAS, C. Personalized Medicine of Alzheimer's Disease. *In*: PADMANABHAN, Sandosh. **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. Academic Press, p. 563-615, 2014.
- CALAÇA, G. N. *et al.* Layer-by-Layer AuNPs-SiPy+/Prussian blue nanoparticles modified electrodes: characterization and electrocatalytic effects. **Electrochimica Acta**, v. 249, p. 104-112, 2017.
- CARNEIRO, M. C. C. G. *et al.* Homemade 3-carbon electrode system for electrochemical sensing: Application to microRNA detection. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 35-44, 2018.
- CHEN, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cells Research**, v. 18, p. 997-1006, 2008.
- CHO, I.; KIM, D. H.; PARK, S. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. **Biomaterials Research**, v. 24, p.1-12, 2020.
- CIMMINO, W. *et al.* Design of a printed electrochemical strip towards miRNA-21 detection in urine samples: optimization of the experimental procedures for real sample application. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, p. 4511-4520, 2023.

CONGUR, G.; EKSIN, E.; ERDEM, A. Impedimetric detection of miRNA-34a using graphene oxide modified chemically activated graphite electrodes. **Sensors and Actuators A: Physical**, v.279, p. 493-500, 2018.

CROCOMO, P. Z. *et al.* Silver Nanoparticles-Silsesquioxane Nanomaterial Applied to the Determination of 4-Nitrophenol as a Biomarker. **Electroanalysis**, v. 31, p. 2319-2329, 2019.

DANGER, B. R. *et al.* Electrochemical studies of capping agent adsorption provide insight into the formation of anisotropic gold nanocrystals. **ACS Nano**, v. 6 (12), p. 10417-11098, 2012.

DE MENEZES, E. W. *et al.* Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, p. 3703-3713, 2012.

DOS SANTOS, V. *et al.* Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Nanoparticle Research**, v.14, 1081, 2012.

ERDEM, A.; EKSIN, E. Zip nucleic acid-based genomagnetic assay for electrochemical detection of microRNA-34a. **Biosensors**, v. 13, p.144, 2023.

ERDEM, A.; EKSIN, E.; CONGUR, G. Indicator-free electrochemical biosensor for microRNA detection based on carbon nanofibers modified screen printed electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 755, p. 167-173, 2015.

GANDUBERT, V. J. LENOX, B. R. Assessment of 4-(Dimethylamino)pyridine as a capping agent for gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 21, p. 6532-6539, 2005.

GE, Q. *et al.* miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. **Molecules**, v. 19, p. 1568-1575, 2014.

GHOSH, S. K. PAL, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 4797-4862, 2007.

GRIESHABER, D. *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.

GUNES, S. *et al.* Biomarkers for Alzheimer's Disease in the Current State: A Narrative Review. **Molecular Sciences**, v. 23(4962), p. 2-10, 2022.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 509-524, 2014.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 87, p. 3-14, 2015.

HAMPEL, H. *et al.* The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 89(8), p. 745-756, 2021.

HÉBERT, S. S.; DE STROOPER, B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. **Trends in Neurosciences**, v. 32(4), p. 199-206, 2009.

HÉBERT, S. S. *et al.* Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/b-secretase expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 105(17), p. 6415-6420, 2008.

HUANG, X.; ZHU, Y.; KIANFAR, E. Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 12, p. 1649-1672, 2021.

JACK JR., C. R. *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, p. 535-562, 2018.

JACKSON, R. J.; HYMAN, B., T.; SERRANO-POZO, A. Multifaceted roles of APOE in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 20, p. 457-474, 2024.

JOLLY, P. *et al.* Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection. **Scientific Reports**, v. 6, 36719, 2016.

JORGE, A. L. *et al.* MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein**, v. 19, p. 1-7, 2021

JUŻWIK, C. A. *et al.* microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. **Progress in Neurobiology**, v. 182, p. 101664, 2019.

KANEKO, Y. Ionic silsesquioxanes: Preparation, structure control, characterization and applications. **Polymer**, v. 144, p. 205-224, 2018.

KICKELBICK, G. Silsesquioxanes. **Structure and Bonding**, v. 155, p. 1-28, 2014.

KIKO, T. *et al.* MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, p. 253-259, 2014.

KIM, J. H. *et al.* Technological advances in electrochemical biosensors for the detection of disease biomarkers. **Biomedical Engineering Letters**, v. 11, p. 309-334, 2021.

KUMAR, A. *et al.* MicroRNA expression in extracellular vesicles as a novel blood-based biomarker for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, p. 4952-4966, 2023.

LANZELLOTTI, C. *et al.* Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 430-437, 2014.

LEUZY, A. *et al.* Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. **EMBO Molecular Medicine**, v. 14, 2021.

LIMA, D. *et al.* Nanoconjugates based on a novel organic-inorganic hybrid silsesquioxane and gold nanoparticles as hemocompatible nanomaterials for promising biosensing applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 112355, 2022.

LIU, J. *et al.* The biogenesis of miRNAs and their role in the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Cells**, v. 11, p. 572, 2022.

LIU, R.; YE, X.; CUI, T. Recent progress of biomarker detection sensors. **Research**, v. 2020, p. 1-26, 2020.

LIU, S. *et al.* MicroRNAs in Alzheimer's disease: Potential diagnostic markers and therapeutic targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112681, 2022.

LONG, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Cell**, v. 179(2), p.312-339, 2019.

LUSARDI, T. A. *et al.* MicroRNAs in human cerebrospinal fluid as biomarkers for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 55, p. 1223-1233, 2017.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. **Sensors**, v. 21(19), p. 6558, 2021.

MA, X. *et al.* Electrochemical detection of microRNAs based on AuNPs/CNNS nanocomposite with Duplex-specific nuclease assisted target recycling to improve the sensitivity. **Talanta**, p. 120441, 2020.

MIGLIONE, A. *et al.* Printed electrochemical strip for the detection of miRNA-29a: A possible biomarker related to Alzheimer's Disease. **Analytical Chemistry**, v. 94, p.15558-15563, 2022.

MITCHELL, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 105, p. 10513-10518, 2008.

MOSSANHA, R. *et al.* Construction of a biosensor based on SAM of thiolactic acid on gold nanoparticles stabilized by silsesquioxane polyelectrolyte for catechol determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 747-756, 2017.

NUNES, M. R. Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, p. 258-265, 2012.

O'BRYANT, S. E. *et al.* Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, p. 45-58, 2016.

PEREIRA, R. L. *et al.* Electrochemical miRNA-34a-based biosensor for the diagnosis of Alzheimer's disease. **Bioelectrochemistry**, v. 154, p. 108553, 2023.

POGUE, A. I.; LUKIW, W. J. Up-regulated Pro-inflammatory MicroRNAs (miRNAs) in Alzheimer's disease (AD) and Age-Related Macular Degeneration (AMD). **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, p. 1021-1031, 2018.

POTHIPOR, C. *et al.* An electrochemical biosensor for simultaneous detection of breast cancer clinically related microRNAs based on a gold nanoparticles/ graphene quantum dots/graphene oxide film. **Analyst**, v. 146, p. 4000-4009, 2021.

RAJAN, K. B. *et al.* Population Estimate of People with Clinical AD and Mild Cognitive Impairment in the United States (2020–2060). **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, p.1966-1975, 2021.

RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19-31, 2017.

SAHA, K. *et al.* Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2739-2779, 2012.

SAITO, Y.; SAITO, H. MicroRNAs in cancers and neurodegenerative disorders. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012.

SAMADIAN, M. *et al.* The Eminent Role of microRNAs in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 641080, 2021.

SHIOYA, M. *et al.* Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 36, p. 320-330, 2010.

SINGH, A. *et al.* Recent Advances in electrochemical biosensors: applications, challenges, and future scope. **Biosensors**, v. 11, p. 331.

SIVALINGAM, A. M.; SURESHKUMAR, D. D. Exosomes in Regulating miRNAs for Biomarkers of Neurodegenerative Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 62, p. 7576-7596, 2025.

SONG, Y. *et al.* Integrated individually electrochemical array for simultaneously detecting multiple Alzheimer's biomarkers. **Biosensors e Bioelectronics**, v. 162, p. 112253, 2020.

SPERLING, R. A. *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, p. 280-292, 2011.

STEINMETZ, M. *et al.* A sensitive label-free impedimetric DNA biosensor based on silsesquioxane functionalized gold nanoparticles for Zika Virus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111351, 2019.

SUNDARAGANESAN, N. *et al.* FT-IR, FT-Raman spectra and ab initio HF and DFT calculations of 4-N,N'-dimethylamino pyridine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 898–906, 2008.

SZYMCZYK, A. *et al.* Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 354, p. 131086, 2022.

THAPA, K.; LIU, W.; WANG, R. Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v.14, p. 1765, 2022.

WINIARSKI, J. P. *et al.* Electrochemical reduction of sulfite based on gold nanoparticles/silsesquioxane-modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 522-531, 2017.

WINIARSKI, J. P. *et al.* A novel hybrid organic–inorganic silsesquioxane and cobalt(II) tetrasulphophthalocyanine material as an efficient electrochemical sensor for the simultaneous determination of the anti-hypertensive nifedipine and its metabolite. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, p. 6839-6850, 2020.

YANG, G. *et al.* DNA methyltransferase 3, a target of microRNA-29c, contributes to neuronal proliferation by regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 1435-1442, 2015.

ZAHREBELNEI, F. *et al.* A sensitive electrochemical DNA biosensor for detecting the genome of a plant growth-promoting bacteria. **Talanta**, 286, p. 127484, 2025.