



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**ERIKA KETLEM GOMES TRINDADE**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSOR PARA IDENTIFICAÇÃO  
DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE B**

**Recife**  
**2015**

**ERIKA KETLEM GOMES TRINDADE**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSOR PARA IDENTIFICAÇÃO  
DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE B**

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Amália Fireman  
Dutra

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Fontana

**Recife**

**2015**

Catálogo na fonte  
Biblioteca Margareth Malta, CRB-4 / 1198

T733d Trindade, Erika Ketlem Gomes.  
Desenvolvimento de nanoimunossensor para identificação de anticorpos contra o vírus da hepatite B / Erika Ketlem Gomes Trindade. - Recife: O Autor, 2015.  
72 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra.  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Fontana  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2015.  
Inclui Referências e Apêndice.

1. Engenharia Biomédica. 2. Imunossensores. 3. Nanomateriais. 4. Nanotubos de Carbono. 5. HBcAg. 6. Anti-HBc. I. Dutra, Rosa Amália Fireman. (Orientadora). II. Fontana, Eduardo. (Coorientador). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2015-135

ERIKA KETLEM GOMES TRINDADE

**DESENVOLVIMENTO DE NANOIMUNOSSENSOR PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA  
HEPATITE B**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Amália Fireman Dutra, Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil.

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE  
Doutor pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Danielly Lima de Oliveira, UFPE  
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Amália Fireman Dutra, UFPE  
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil.

Recife, 26 de Fevereiro de 2015.

Alguns homens veem as coisas como são e dizem  
“Por quê?”. Eu sonho com as coisas que nunca  
foram e digo “Por que não?”.

*Geroge Bernard Shaw*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, *Elias e Lourdes*, pela base, apoio e incentivo aos meus estudos desde sempre, pela paciência, amor verdadeiro e oportunidades oferecidas para minha formação acadêmica e pessoal.

À minha orientadora *Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Dutra* por tudo que me ensinou, pela paciência, incentivo, oportunidades e compreensão durante esses anos de pesquisa e estudo.

Ao meu Coorientador *Prof. Dr. Eduardo Fontana* por abrir as portas do seu laboratório.

A toda minha família, em especial ao meu tio *Luiz Antônio*, minha irmã *Keity* e meu cunhado *Everton*, pelo apoio durante os anos de estudo.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (*FACEPE*) pelo apoio financeiro.

Às minhas queridas amigas *Aline, Maria e Camila* pela amizade verdadeira, pela ajuda e por tudo durante tantos anos.

Aos amigos *Marcela, Hildemário, Luiz Paulo, Flávio e Dócles* pelo carinho.

Aos companheiros do *LEB* pela ajuda e pelas sugestões, que tanto contribuíram para a minha pesquisa, principalmente *Erika, Cybelle, Diego Guerra e Priscila*.

Aos amigos do *Mestrado*, por juntos termos alcançado o que desejamos e conseguirmos superar todas as dificuldades.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para meu trabalho ou que melhoraram a minha vida de alguma forma nesses últimos dois anos.

## RESUMO

A infecção com o Vírus da Hepatite B (HBV) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo têm infecção crônica pelo HBV, o que representa aproximadamente 5% da população mundial. Levando-se em conta que a transmissão do HBV ocorre principalmente pelas vias parenteral e sexual, bolsas de sangue devem ser rigorosamente controladas. Um teste rápido antes da doação para identificar o marcador do HBV é desejável para reduzir os custos com o descarte desnecessário de bolsas de sangue. Atualmente, os anticorpos produzidos contra os antígenos do core do vírus da hepatite B (anti-HBc IgG) têm sido relatados como o marcador mais prevalente para o HBV devido a persistir por toda a vida e indicam infecção passada. Imunossensores são dispositivos analíticos que utilizam antígenos ou anticorpos e um transdutor para detecção rápida e quantificação de analitos e também podem ser portáteis. Diferentes tipos de transdutores para imunossensores são utilizados, tais como eletroquímico, óptico e piezoelétrico. As técnicas eletroquímicas têm como princípio básico a detecção de espécies eletroativas presentes no processo de interação do elemento biológico com o transdutor. Transdutores eletroquímicos amperométricos estão entre os mais utilizados, devido à sua facilidade para portabilização. Os nanomateriais e os polímeros funcionalizados têm atraído grande interesse no desenvolvimento de matrizes de imobilização para biossensores devido a proporcionarem maior estabilidade e maior área para ancoramento de biomoléculas. Quando os nanotubos de carbono carboxilados são associados com politiramina, eles formam ligações amida que permitem que esta superfície seja muito mais estável, aumentando a precisão analítica. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor para detecção do anti-HBc através da imobilização do antígeno do HBc (HBcAg) em um eletrodo de ouro nanoestruturado formado por nanotubos de carbono carboxilados e politiramina. As modificações no eletrodo foram acompanhadas por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Foi obtida uma matriz estável, com processo de interação reversível e com possibilidade de portabilização. A faixa linear de resposta foi de 1,0 a 5,0 ng/mL, com limite inferior de detecção de 0,1ng/mL, mostrando grande sensibilidade para o anticorpo. Para uso clínico, o protótipo precisa ser validado em mais amostras sorológicas.

**Palavras-chave:** Imunossensores. Nanomateriais. Nanotubos de Carbono. HBcAg. Anti-HBc.

## ABSTRACT

Infection with Hepatitis B Virus (HBV) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. An estimated 350 million people have chronic HBV infection, which represents approximately 5% of the world population. Taking into account that transmission of HBV occurs mostly by via parenteral and sexual, blood bags should be tightly controlled. A quick test before donating to identify the marker of HBV is desirable to reduce unnecessary costs to dispose of blood bags. Currently, antibodies against the core antigen of hepatitis B (anti-HBc IgG) have been reported as the most prevalent marker for HBV virus due to persist throughout life, indicating past infection. Immunosensors are analytical devices that use antigens or antibodies, and a transducer for rapid detection and quantification of analytes and can also be portable. Different types of transducers for immunosensors are used, such as electrochemical, optical and piezoelectric. Electrochemical techniques have as basic principle the detection of electroactive species present in the interaction process of the biological element with the transducer. Amperometric electrochemical transducers are among the most widely used due to be easily portabilized. And nanomaterials functionalized polymers have attracted great interest in the development of immobilization matrices for biosensors owing to provide greater stability and larger area for biomolecule anchoring. When the carboxylated carbon nanotubes are associated with polytyramine they form amide bonds that allow the surface to be much more stable, enhancing the analytical precision. This work aimed at the development of an immunosensor for the detection of anti-HBc by immobilizing the HBc antigen (HBcAg) in a nanostructured gold electrode formed by carboxylated carbon nanotubes and polytyramine. The changes in the electrode were followed by cyclic voltammetry and square wave voltammetry. A stable matrix was obtained, with reversible interaction process and the possibility of portabilization. The linear response range was 1.0 to 5.0 ng/ml, with a lower detection limit of 0.1 ng/mL, showing great sensitivity to the antibody. For clinical use, the prototype must be validated in more serum samples.

**Keywords:** Immunosensors. Nanomaterials. Carbon Nanotubes. HBcAg. Anti-HBc.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1* Esquema mostrando o vírus da hepatite B. 15
- Figura 2* Prevalência de portadores da Hepatite B no mundo. (Fonte: Adaptada de HWANG, CHEUNG, 2011). 22
- Figura 3* Esquema de funcionamento de um biossensor. 23
- Figura 4* Crescimento no número de publicações envolvendo biossensores (Pesquisa das palavras “biossensor” e “market” no período de 2013 a 2015, Web of Knowledge) (Fonte: Adaptado de KIRSCH ET AL, 2013). 25
- Figura 5* Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica ( $I_{pc}$ ) e anódica ( $I_{pa}$ ). 26
- Figura 6* Esquema de voltametria de onda quadrada (Fonte: PACHECO ET AL, 2013). 30
- Figura 7* Crescimento no número de citações envolvendo a frase “biossensor for hepatitis B”, pesquisa feita no Web of Knowledge. 31
- Figura 8* Esquema mostrando o monômero de tiramina (a) e a politiramina (b). (Fonte: Adaptado de EHSANI ET AL, 2014). 36
- Figura 9* Nanotubo de carbono de múltiplas paredes (Fonte: HERBST ET AL, 2004). 38
- Figura 10* Representação de um sistema trieletródico. 39
- Figura 11* Esquema exibindo as etapas de construção da plataforma imunossensora e imunoensaio. 40
- Figura 12* Curva de concentração da tiramina com valores de concentração de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 mmol L<sup>-1</sup>. 38
- Figura 13* Voltamogramas cíclicos mostrando o eletrodo limpo (a) e o eletrodo após a polimerização da tiramina(b). 39
- Figura 14* Curva de tempo de ativação dos nanotubos em EDC/NHS com tempos variando de 15 a 60 minutos. 40

- Figura 15* Aumento da área eletroativa após deposição de nanotubos de carbono ativados com EDC/NHS sobre filme de politiramina. 41
- Figura 16* Gráfico de Voltametria de Onda Quadrada demonstrando os picos apenas com o filme de politiramina e após a adição dos nanotubos. 41
- Figura 17* Alteração no potencial do pico de redução após a adição de HBcAg. 42
- Figura 18* Redução do pico de corrente após a adição de glicina.
- Figura 19* VCs mostrando estabilidade da matriz de politiramina com nanotubos de carbono após 15 ciclos consecutivos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . 43
- Figura 20* a) Voltamogramas cíclicos nas velocidades de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e  $120 \text{ mV s}^{-1}$  (de dentro para fora); (b) Variação os picos de corrente com relação à raiz quadrada da velocidade de varredura. 43
- Figura 21* Efeito da adição de  $0,1 \text{ ng/mL}$  de anti-HBc sobre o VOQ da matriz de imobilização na presença de  $100 \mu\text{g/mL}$  de HBcAg. 44
- Figura 22* Curva de limite de detecção do anti-HBc com valores obtidos no potencial de  $0,5 \text{ V}$ . 45

## LISTA DE TABELAS

*Tabela 1*      *Marcadores da Hepatite B e suas características (Ministério da Saúde, 2005).*      20

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<i>Anti-HBc</i>	<i>Anticorpos contra o HBcAg</i>
<i>Anti-HBe</i>	<i>Anticorpos contra o HBeAg</i>
<i>Anti-HBs</i>	<i>Anticorpos contra o HBsAg</i>
<i>CHC</i>	<i>Carcinoma Hepatocelular</i>
<i>DMF</i>	<i>Dimetilformamida</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<i>E</i>	<i>Potencial</i>
<i>EA</i>	<i>Eletrodo Auxiliar</i>
<i>EAU</i>	<i>Eletrodo de trabalho de ouro</i>
<i>EDC</i>	<i>1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida</i>
<i>ER</i>	<i>Eletrodo de Referência</i>
<i>FTIR</i>	<i>Microscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<i>HBcAg</i>	<i>Antígeno do Core do Vírus da Hepatite B</i>
<i>HBeAg</i>	<i>Antígeno “e” do Vírus da Hepatite B</i>
<i>HBsAg</i>	<i>Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B</i>
<i>HBV</i>	<i>Vírus da Hepatite B, do inglês Hepatitis B vírus</i>
<i>I</i>	<i>Corrente</i>
<i>IgG</i>	<i>Imunoglobulina G</i>
<i>IgM</i>	<i>Imunoglobulina M</i>
<i>MEV</i>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
<i>MWNTs</i>	<i>Nanotubos de múltiplas paredes, do inglês Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>
<i>NHS</i>	<i>N-hidroxisuccinimida</i>

<i>NTC-COOH</i>	<i>Nanotubos de Carbono Carboxilados</i>
<i>NTCs</i>	<i>Nanotubos de Carbono</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<i>OS</i>	<i>Plasmons de Superfície</i>
<i>Poli-Tyr</i>	<i>Politiramina</i>
<i>QCM</i>	<i>Microbalança de Cristal de Quartzo, do inglês Quartz Crystal Microbalance</i>
<i>SPR</i>	<i>Ressonância de Plasmon de Superfície, do inglês Surface Plasmon Resonance</i>
<i>SUS</i>	<i>Sistema Único de Saúde</i>
<i>SWCNT</i>	<i>Nanotubos de parede simples, do inglês Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
<i>VC</i>	<i>Voltametria Cíclica</i>
<i>VOQ</i>	<i>Voltametria de Onda Quadrada</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1. HEPATITE B .....	17
2.2. DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B.....	20
2.2.1. Marcadores da Hepatite B .....	20
2.3. BIOSSENSORES .....	22
2.3.1. Classificação dos biossensores quanto ao biorreceptor.....	23
2.3.2. Classificação dos biossensores quanto ao transdutor .....	24
2.3.3. Biossensores para Hepatite B .....	26
2.4. MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA .....	28
2.4.1. Filmes poliméricos.....	28
2.4.2. Nanotubos de Carbono.....	30
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. OBJETIVOS .....	33
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
5. METODOLOGIA .....	34
5.1. REAGENTES.....	34
5.2. EQUIPAMENTOS E MEDIÇÕES .....	34
5.3. MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA.....	35
5.3.1. Polimerização da tiramina.....	35
5.3.2. Deposição dos nanotubos de carbono .....	35
5.4. RESPOSTA ANALÍTICA .....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
6.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TIRAMINA.....	38
6.2. MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA .....	40
6.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE E MECANÍSTICOS.....	44
6.4. RESPOSTA ANALÍTICA .....	45
6. CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS .....	49
Apêndice: Artigo a ser submetido para publicação .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) representa uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo tenham infecção crônica pelo HBV, representando aproximadamente 5% do total da população. A transmissão do HBV se faz fundamentalmente através das vias parenteral e sexual (ALVARIZ, 2006; FERREIRA, 2000).

Por se tratar de uma doença infectocontagiosa de grande morbimortalidade, é grande a preocupação dos serviços de saúde pública na contenção e prevenção da doença. Neste sentido, os serviços de hemoterapia realizam a investigação de marcadores sorológicos que possam denunciar o contágio ou a infecção pelo HBV nas bolsas de sangue coletadas. No entanto, esses testes apenas são feitos após a coleta do sangue, o que proporciona uma grande taxa de descarte de bolsas nesses serviços. Embora diminuindo, essa taxa ainda continua alta no Brasil quando comparado com países desenvolvidos. Por isso, a infecção pelo HBV é uma das principais causas dos descartes das bolsas de sangue (SALLES ET AL, 2003). Neste sentido, alternativas diagnósticas rápidas e sensíveis na intenção de reduzir os custos com bolsas de sangue nos hemocentros, tais como os biossensores, têm sido consideradas.

Biossensores são dispositivos analíticos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento para detecção de analitos-alvo. Tais dispositivos combinam um sistema de detecção (receptor biológico que fará o reconhecimento do analito), transdução (que irá transformar essa ligação em um sinal que possa ser medido) e amplificação do sinal gerado nos processos de biorreconhecimento (que permitirão a visualização desse sinal). Quando imunoglobulinas ou antígenos são utilizados como biorreceptor em biossensores, estes podem ser classificados como imunossensores (WANG, 2006; RICCARDI ET AL, 2002). Esses dispositivos podem possuir inúmeras vantagens frente aos métodos tradicionais de diagnóstico, devido a serem dispositivos menores e facilmente manuseáveis, fornecendo a resposta em poucos minutos (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Os imunossensores são baseados em reações imunológicas específicas, tendo antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Atualmente, os anticorpos que são produzidos contra o antígeno do core do vírus da Hepatite B (anti-HBc) foram reportados como os mais importantes marcadores na triagem de pacientes que tiveram contato com o vírus da Hepatite B. Todos os anti-HBc indicam infecção, sendo que a IgG anti-HBc persiste por toda a vida e indica infecção passada, sendo por isso a mais usada (KWON, LEE, 2011; CASTELO ET AL, 2007).

Nos biossensores, os transdutores são responsáveis pela transformação da interação bioquímica (reconhecimento do evento biológico) em um sinal elétrico, passível de quantificação. Dentre os transdutores para imunossensores, os eletroquímicos são os mais comumente utilizados, pois são mais simples, têm menor custo, alta sensibilidade e portabilidade. Este tem potencial para ser uma das principais ferramentas para o diagnóstico rápido e preciso de doenças, com o objetivo de direcionar a um tratamento imediato e maior sobrevivência dos pacientes (JIN ET AL., 2006; MEHRVAR, ABDI, 2004).

Entretanto, independente do transdutor, ainda há certos desafios enfrentados frequentemente na produção de um biossensor, como diminuir seu limite de detecção e aumentar a sensibilidade, estabilidade em longo prazo e problemas de transferência de elétrons. Com o objetivo de melhorar estes parâmetros, tem sido bastante explorado o uso de polímeros funcionalizados e nanomateriais. Polímeros condutores funcionalizados são vantajosos para o uso em biossensores, pois aumentam a estabilidade da matriz de imobilização, têm uma alta resistência mecânica, possuem estabilidade no ar e em soluções aquosas, além de sua gama de funcionalização permitir uma maior maleabilidade para imobilização de várias biomoléculas (IONESCU ET AL, 2009).

Os nanomateriais (tais como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e nanopartículas poliméricas) são também empregados no desenvolvimento de plataformas sensoras. A utilização destes nanomateriais possibilita uma maior rugosidade da superfície sensora, proporcionando maior área ativa para imobilização das biomoléculas, aumentando a sensibilidade do biossensor. Além disso, alguns desses nanomateriais como nanopartículas poliméricas e nanotubos de carbono podem ser funcionalizados com grupamentos que possibilitem uma ligação mais estável com a matriz de filme polimérico. Neste contexto, os nanotubos de carbono vêm se destacando nas últimas décadas. Estes são cilindros de carbono com os átomos de carbono ligados de forma covalente aos seus vizinhos. Os nanotubos promovem um aumento significativo na área para imobilização das biomoléculas e da transferência de elétrons, promovendo assim o aumento da sensibilidade (GOMES-FILHO ET AL., 2012; WANG ET AL, 2003).

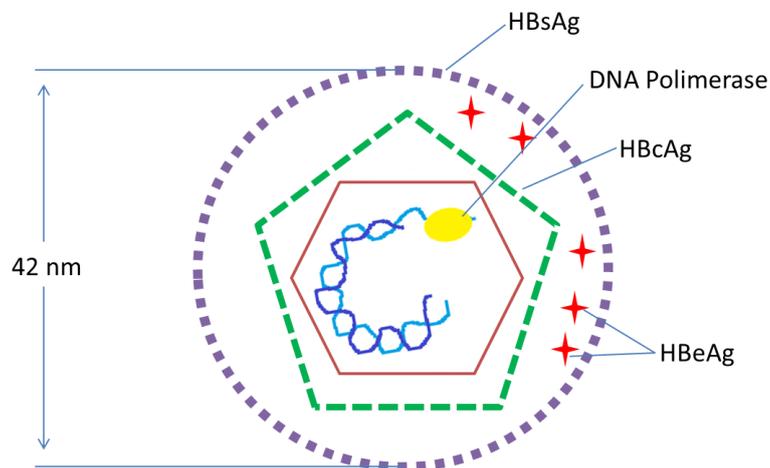
Neste trabalho foi desenvolvido protótipo de biossensor, a partir da imobilização do antígeno do core do vírus da Hepatite B formada por politiramina e nanotubos de carbono em transdutor eletroquímico, capaz de reconhecer baixos níveis de anticorpos produzidos contra o core do vírus da Hepatite B, visando sua adaptação para que possa ser utilizado em bancos de sangue.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. HEPATITE B

O vírus da Hepatite B (HBV) humano é um pequeno vírus da família hepadnaviridae com 42 nm de diâmetro, composto por um envelope lipídico, onde existem várias proteínas de superfície, e pelo nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo abriga o material genômico viral, composto por duas fitas de DNA de extensões diferentes, com aproximadamente 3200 pares de base (Figura 1) (ALVARIZ, 2006).

**Figura 1:** Esquema mostrando o vírus da hepatite B.



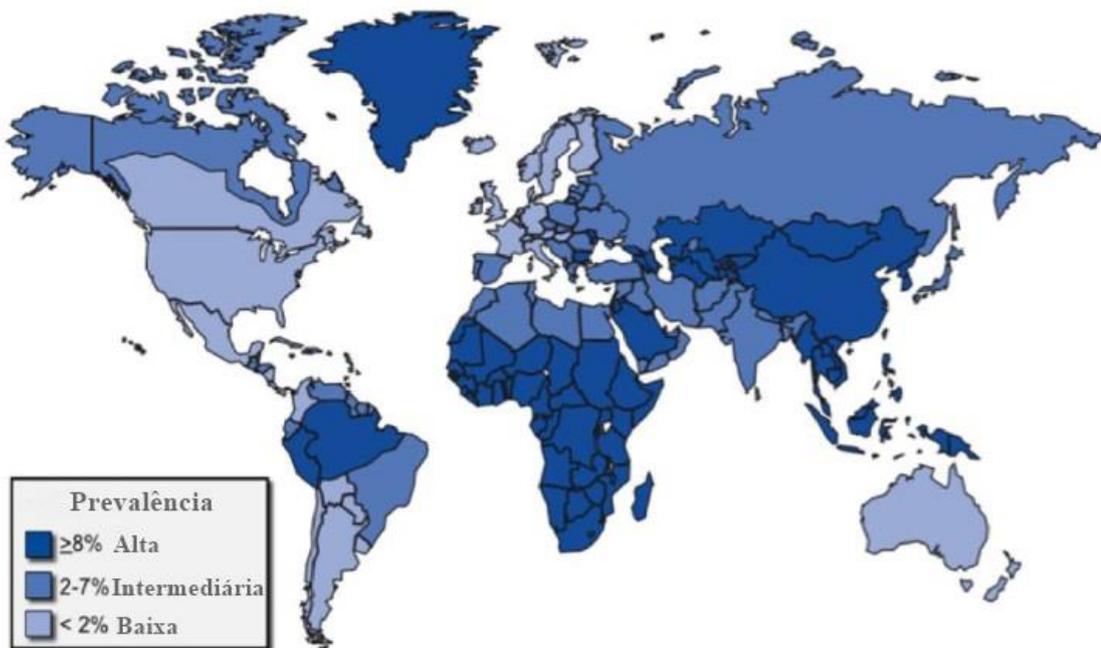
**Fonte:** TRINDADE (2015).

A infecção pelo vírus usualmente tem curso clínico bastante prolongado, apresentando período de incubação de 40 a 180 dias e janela imunológica podendo levar até mesmo anos para apresentar sintomas. Sua transmissão é predominantemente parenteral (transfusões e agulhas contaminadas), mas também pode ocorrer por contato sexual e, em menor proporção, através de exposição à saliva e outras excreções potencialmente contaminadas. Em 50% dos casos de hepatite B não há história de exposição parenteral. Entre 1 e 10% das infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) evoluem para a forma crônica: portador assintomático, hepatite crônica ativa ou persistente, cirrose hepática e carcinoma hepático. Hepatite fulminante ocorre em 1% dos pacientes (BARONE, 2008; FERREIRA; BORGES, 2007). Os determinantes da evolução da infecção e severidade da doença estão relacionados principalmente a fatores do hospedeiro tais como: idade, sexo, raça, genética, imunocompetência e estado nutricional. O impacto socioeconômico para o Sistema Único de Saúde (SUS) associado à infecção crônica

pelo HBV é grande nas áreas endêmicas, principalmente quando evolui para carcinoma hepatocelular (CHC) e/ou cirrose, que ocorrem devido à evolução da doença hepática, causando décadas de vida produtiva comprometida (HWANG, CHEUNG, 2011; CASTELO ET AL., 2007).

A infecção pelo HBV representa uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo tenham infecção crônica pelo HBV, representando aproximadamente 5% do total da população (Figura 2). Estima-se que pelo menos um terço da população mundial já esteve em contato com o vírus (FERREIRA, 2000; ALVARIZ, 2006).

**Figura 2:** Prevalência de portadores da Hepatite B no mundo.



**Fonte:** Adaptada de HWANG, CHEUNG, 2011.

Por se tratar de uma doença infectocontagiosa de grande morbimortalidade, é grande a preocupação dos serviços de saúde pública na contenção e prevenção da doença. Neste sentido, os serviços de hemoterapia realizam a investigação de marcadores sorológicos que possam denunciar o contágio ou a infecção pelo HBV nas bolsas de sangue coletadas. No entanto, esses testes apenas são feitos após a coleta do sangue, o que proporciona uma grande taxa de descarte de bolsas nesses serviços. Embora diminuída, essa taxa ainda continua alta no Brasil (10 a 20%), quando comparada às de países desenvolvidos (4% ou menos). Portanto, a

infecção pelo HBV é constituída numa das principais causas dos descartes das bolsas de sangue no país (SALLES ET AL, 2003).

## **2.2. DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B**

O diagnóstico da Hepatite B pode ser feito de forma direta ou indireta. De forma indireta, diferentes marcadores laboratoriais podem ser utilizados como ferramentas de detecção da doença. Dentre eles estão as aminotransferases ou transaminases - aspartato aminotransferase (AST/TGO) e alanina aminotransferase (ALT/TGP) –, as quais são marcadores de agressão hepática e podem começar a elevar-se cerca de uma semana antes do início da icterícia. As bilirrubinas também podem indicar doença hepática, podendo alcançar valores 20 a 25 vezes acima do normal no caso das hepatites. Outro marcador indireto utilizado é a alfafetoproteína, a qual se encontra aumentada em caso de hepatite crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O diagnóstico direto é feito através da pesquisa dos marcadores sorológicos do HBV principalmente através das técnicas de ELISA e imunocromatografia. ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos a partir da utilização de uma solução com anticorpos marcados com uma enzima, os quais irão competir com os anticorpos da amostra a ser analisada (sem marcação). Assim, ao final do teste é adicionado o substrato específico da enzima utilizada e, caso o resultado seja positivo, não haverá reação enzima-substrato (representada por uma mudança de cor da solução), pois o anticorpo da amostra analisada estará em maior quantidade em comparação com o anticorpo marcado com a enzima (BRANDÃO ET AL, 2001).

A técnica de imunocromatografia é utilizada em testes rápidos, onde são imobilizados antígenos ou anticorpos em uma fita de nitrocelulose. Uma gota do sangue do paciente é adicionada à fita e, com a adição de um tampão, observa-se a mudança de cor na fita, no caso de resultado positivo. É mais rápido do que o diagnóstico por ELISA, mas menos confiável, visto que em caso de resultado positivo, é necessário fazer a confirmação do resultado (PELIÇÃO, 2007).

### **2.2.1. Marcadores da Hepatite B**

Atualmente existem seis tipos de marcadores disponíveis rotineiramente para diagnóstico de hepatite B aguda ou crônica, para o acompanhamento dos pacientes e monitoração do tratamento (Tabela 1). O primeiro marcador a aparecer é o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), o qual está presente desde o período de incubação

da doença. Normalmente desaparece após três a quatro meses depois da infecção e sua presença após seis meses indica cronicidade da doença (SOUTO ET AL, 2001).

**Tabela 1:** Marcadores da Hepatite B e suas características.

Marcador	Características
HBsAg	Fase aguda e crônica. É o primeiro marcador a surgir e desaparece dentro de 24 semanas. Sua presença após este tempo indica cronicidade.
Anti-HBc IgM	Fase aguda. É marcador de infecção recente e é encontrado até 32 semanas após infecção.
Anti-HBc IgG	Fases aguda e crônica. Indica contato com o vírus.
HBeAg	Fase crônica. Está presente durante o período de maior infecciosidade.
Anti-HBe	Fase aguda. Está presente no fim da infecção aguda e após o período de convalescença, indicando infecção no passado recente.
Anti-HBs	Surge após a fase aguda e confere imunidade ao vírus. Também está presente após vacinação.

**Fonte:** Adaptada de Ministério da Saúde, 2005.

Durante a fase aguda, mais tardiamente, surgem o antígeno “e” do HBV (HBeAg) e as imunoglobulinas IgG e o IgM contra o antígeno do core do vírus (HBcAg). O HBeAg não desempenha nenhum papel na formação viral, e sua função não é clara. Sabe-se apenas que este surge no período de maior infecciosidade e tem forte correlação com a evolução para a forma crônica da doença (GANEM, PRINCE, 2014).

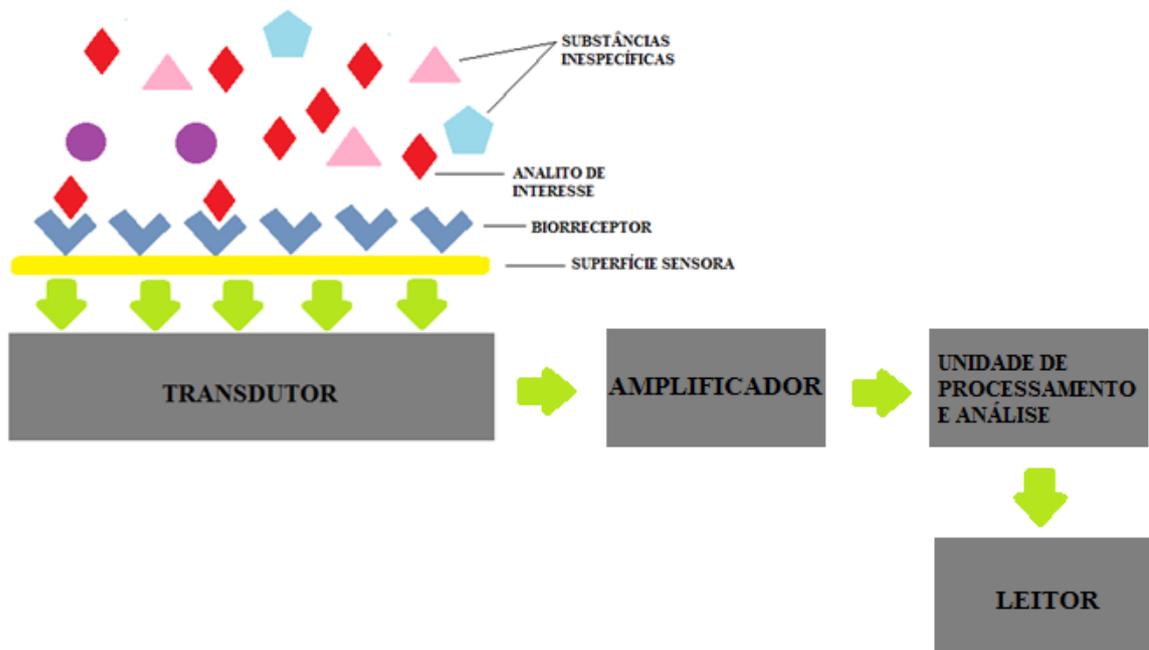
O anti-HBe se encontra presente no final da fase aguda e após o período de convalescença, indicando infecção passada recente. No último caso, este desaparece após uma ou dois anos. Já o anti-HBs permanece após o período de recuperação, conferindo imunidade. Este pode também ser detectável em caso de imunização via vacinação (REHERMANN, NASCIMBENI, 2005; MIRANDA ET AL, 2000).

O anti-HBc IgM é o primeiro anticorpo detectável e, juntamente com o anti-HBc total podem ser os únicos marcadores detectáveis no período entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anti-HBs. Atualmente todos os anti-HBc foram reportados como os mais importantes marcadores na triagem de pacientes que tiveram contato com o vírus da Hepatite B, sendo que a IgG anti-HBc persiste por toda a vida e indica infecção passada, sendo por isso a mais usada para diagnóstico de triagem dos pacientes (KWON, LEE, 2011; CASTELO ET AL, 2007; WEBER ET AL, 2001).

### 2.3.BIOSSENSORES

Os biossensores são ferramentas analíticas que utilizam um elemento bioativo e um transdutor para a detecção e/ou quantificação de substâncias bioquímicas nas mais variadas aplicações (Figura 3). Há vários tipos de biossensores, classificados de acordo com o transdutor (óptico, eletroquímico, piezelétrico), ou de acordo com a biomolécula imobilizada na superfície de detecção – o biorreceptor, que podem ser enzimas, DNA, anticorpos, entre outros (BORISOV, WOLFBEIS, 2008).

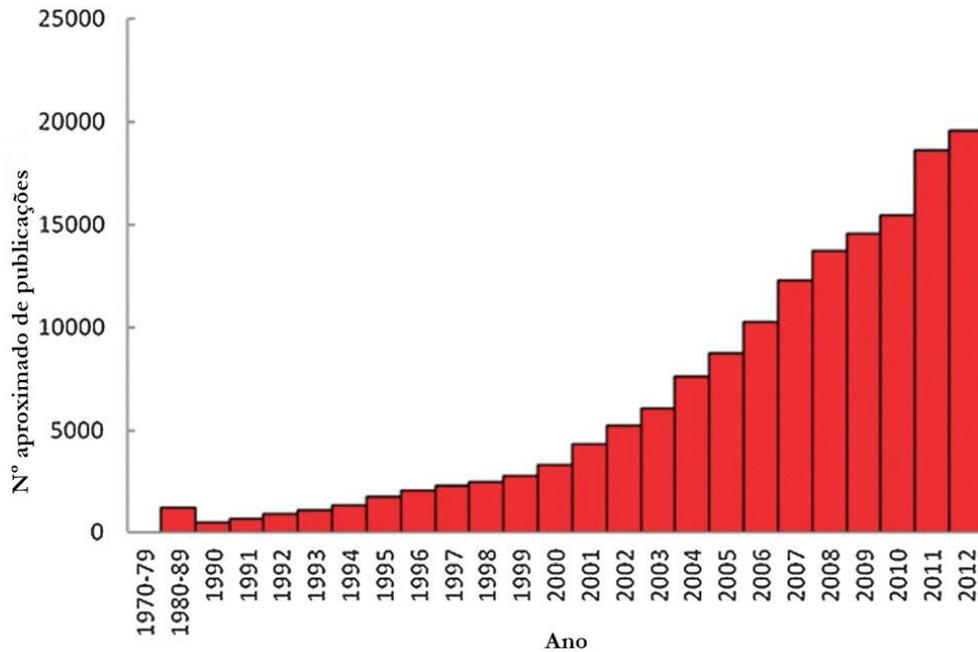
**Figura 3:** Esquema de funcionamento de um biossensor.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

Este campo tem evoluído bastante nas últimas décadas, com surgimento cada vez maior de novas tecnologias, de forma que o mercado de biossensores se encontra em crescimento. Esta é uma área multidisciplinar, com investimentos vindos de diversos campos de pesquisa e desenvolvimento, e com, portanto, um crescente número de publicações relacionadas (Figura 4) (KIRSCH ET AL, 2013; TURNER, 2013).

**Figura 4:** Crescimento no número de publicações envolvendo biossensores (Pesquisa das palavras “biossensor” e “market” no período de 2013 a 2015, Web of Knowledge)



**Fonte:** Adaptado de KIRSCH ET AL, 2013.

Os biossensores são ferramentas atraentes porque são fáceis e econômicos, e podem alcançar limites de detecção excelentes com volumes pequenos de analito. Além disso, a instrumentação necessária é relativamente simples e pode ser facilmente portabilizada, o que facilita o desenvolvimento de dispositivos descartáveis e metodologias para quantidades ultrapequenas de amostra. Eles podem ser classificados de acordo com o elemento receptor e com ao elemento transdutor (LUONG ET AL, 2008; TANG ET AL, 2004).

### 2.3.1. Classificação dos biossensores quanto ao biorreceptor

Podemos classificar os biossensores em relação ao tipo de mecanismo de reconhecimento do biorreceptor. Quando o sinal envolve a formação de imunocomplexo antígeno-anticorpo ou ligação proteica, é chamado biossensor por bioafinidade (ANDRADE, 2006; LUPPA ET AL, 2001). Por outro lado, nos casos em que a interação receptor-analito é baseada na ocorrência de reações químicas a partir de um ou mais substratos, sem o consumo do biocatalizador, que pode ser regenerado, o biossensor é descrito como biossensor catalítico (MARAZUELA, MORENO-BONDI, 2002).

Os principais biorreceptores utilizados nestes dispositivos são enzimas, ácidos nucléicos (DNA e RNA) e anticorpos ou antígenos (biossensores enzimáticos, genossensores e imunossensores, respectivamente). Micro-organismos, células animais e vegetais e cortes de tecidos também podem ser usados (VELASCO-GARCIA, 2009).

Um dos mais específicos biossensores da atualidade é o imunossensor, o qual se baseia em reações imunológicas específicas, tendo antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. A ligação entre antígeno e anticorpo é extremamente específica, obedecendo ao modelo de chave-fechadura. (BORISOV, WOLFBEIS, 2008; TANG ET AL, 2004).

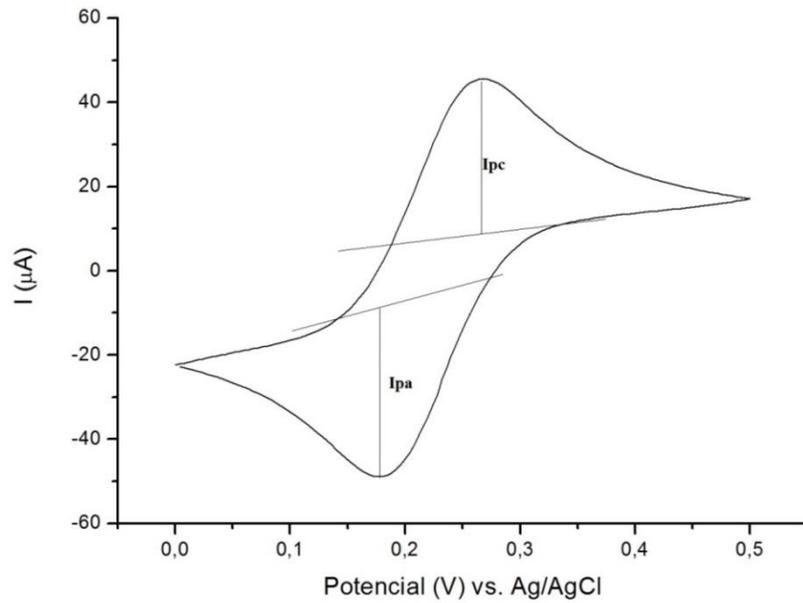
### **2.3.2. Classificação dos biossensores quanto ao transdutor**

O princípio de energia envolvido na transdução varia bastante, sendo que os principais são os transdutores acústicos (Microbalança de Cristal de Quartzo - QCM), os quais têm a propriedade de converter um sinal elétrico em deformações (vibrações) mecânicas, os transdutores eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos), que têm o princípio de detectar espécies eletroativas resultante das reações ocorridas no meio, e transdutores ópticos (Ressonância de Plasmon de Superfície – SPR, dentre outros), os quais se baseiam na detecção das mudanças de absorção de radiação eletromagnética na região do visível/infravermelho que ocorre entre os elementos reagentes e os produtos da reação (WU ET AL, 2007; TANG ET AL, 2006; PAVEY ET AL, 2003)

Os transdutores eletroquímicos têm como princípio básico a detecção de espécies eletroativas presentes no processo de interação do elemento biológico com o transdutor. Estes transdutores são os mais comumente utilizados em biossensores, pois são mais simples, têm menor custo, alta sensibilidade e portabilidade. São feitas modificações para o acoplamento das moléculas biológicas à superfície do eletrodo eletroquímico, onde impulsos elétricos tais como corrente (I) ou potencial (E) são aplicados a este sistema para que a leitura da amostra seja feita (JIN ET AL., 2006; MEHRVAR, ABDI, 2004 ).

A principal técnica eletroquímica utilizada para caracterizar superfícies eletródicas é a voltametria cíclica (VC), a qual traz informações sobre a interação do eletrodo com a solução em que este está em contato. Realiza-se a varredura de potencial em vários ciclos sucessivos, observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa (Figura5) (SADIK ET AL, 2009; KISSINGER, HEINEMAN, 1996).

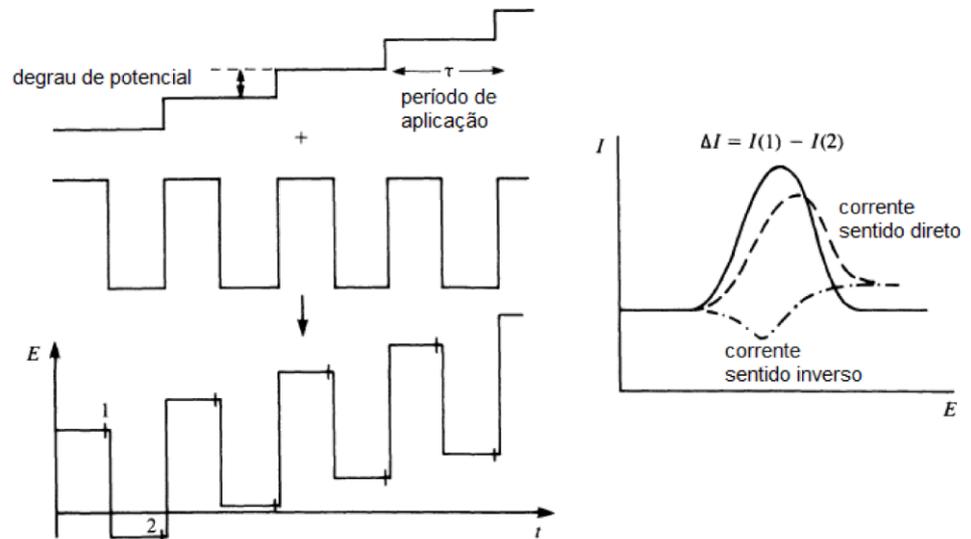
**Figura 5:** Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica ( $I_{pc}$ ) e anódica ( $I_{pa}$ ).



**Fonte:** TRINDADE (2015).

Entretanto, a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) é considerada mais sensível do que a VC na caracterização de alterações na superfície sensora. Esta tem a capacidade de apresentar a saída de corrente sob a forma de um pico simétrico e a capacidade de medir a corrente faradáica num momento em que a dupla camada de corrente de carregamento é desprezível(Figura6) (KISSINGER, HEINEMAN, 1996).

**Figura 6:** Esquema de voltametria de onda quadrada.



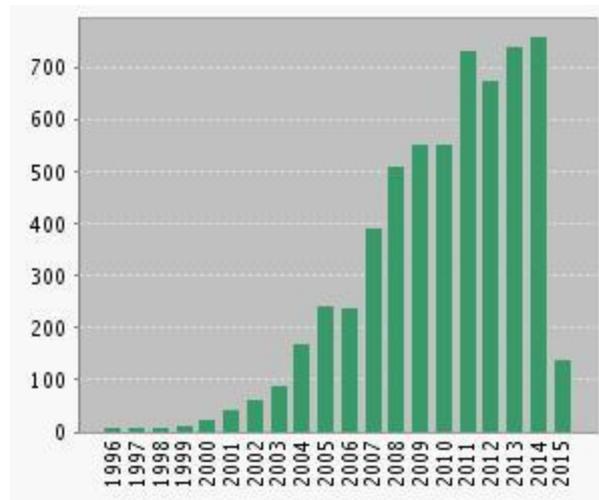
**Fonte:** PACHECO ET AL (2013).

No entanto, sua sensibilidade é limitada pelo ruído capilar. Uma vez que o potencial de varrimento é descontínuo, em vez de linear, os topos dos impulsos permanecem estáveis, mesmo a rápidas velocidades de varredura (OSTERYOUNG, OSTERYOUNG, 1985; RAMALEY, KRAUSE JR, 1969).

### 2.3.3. Biossensores para Hepatite B

Nos últimos anos, o número de biossensores utilizados tanto em pesquisa quanto na clínica como, por exemplo, o glicosímetro, vem aumentando de forma impressionante. A maioria dos biossensores desenvolvidos em pesquisa, na atualidade, é baseada em reações imunológicas ou hibridização de DNA, e os testes garantem resultados rápidos com grande sensibilidade. Com o grande número de pacientes contaminados e sob o risco de contaminação pela hepatite B, também cresceu o número de biossensores focados para esta doença (Figura 7). Os biossensores para hepatite B são principalmente baseados nas reações dos anticorpos contra o HBc e HBs (imunossensores), e na hibridização da dupla fita viral (genossensores) (YAO, FU, 2014).

**Figura 7:** Crescimento no número de citações envolvendo a frase “biosensorfor hepatitis B”, pesquisa feita no Web of Knowledge.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

Foram reportados tanto genossensores quanto imunossensores para detecção do HBV, sendo os genossensores o principal foco da maioria dos trabalhos encontrados. Quanto aos imunossensores, o mais observado é o uso do antígeno se superfície do HBV, para detecção do anti-HBs. Diversos métodos de detecção foram empregados, como ópticos e eletroquímicos, sendo os métodos eletroquímicos os mais abundantes relacionados com a hepatite B, embora métodos ópticos como a SPR tenham sido bastante usados no desenvolvimento destes dispositivos (CASTRO ET AL, 2014; YAO, FU, 2014; ALIPOUR, 2013).

## **2.4.MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA**

Uma das etapas determinantes na preparação de um biossensor é a imobilização das biomoléculas sobre a superfície do eletrodo. Diferentes técnicas de modificação da superfície eletródica têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a estabilidade e a sensibilidade destes sensores (WANG ET AL, 2002; FREIRE ET AL, 2003)

Para permitir o funcionamento dos biossensores, o biorreceptor tem que ser imobilizado de maneira estável, porém sem haver perda da atividade biológica. As técnicas mais comuns para a incorporação das biomoléculas são a adsorção física e a ligação covalente. Na adsorção, a biomolécula é fixada na superfície do eletrodo através de ligações físicas fracas como forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. No entanto, essa abordagem é menos utilizada em biossensores, pois algumas biomoléculas podem ser mais facilmente dissociadas da superfície do transdutor por variação de pH ou força iônica na solução, produzindo dispositivos pouco estáveis (MENDES, 2006).

No entanto, a abordagem mais utilizada para a modificação na superfície do eletrodo é a ligação covalente, onde é feita a ligação química entre grupos funcionais da biomolécula e grupos funcionais do material do eletrodo, e geralmente envolve a ativação da superfície do sensor ou da molécula, o acoplamento do biorreceptor e remoção das moléculas fracamente ligadas, formando superfícies muito mais estáveis (LOJOU & BIANCO, 2006).

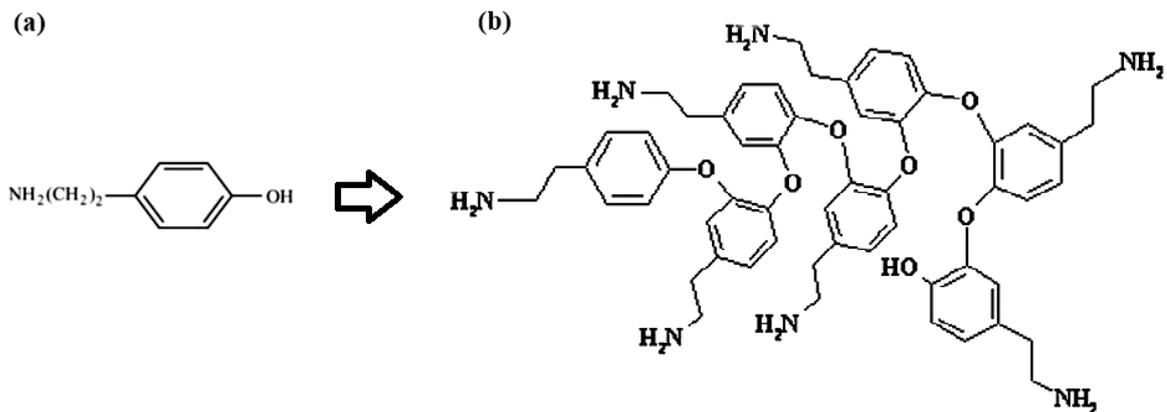
### **2.4.1. Filmes poliméricos**

Polímeros funcionalizados têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de biossensores e têm substituído materiais convencionais, como membranas iônicas, semicondutores orgânicos e óxidos metálicos. Estudos têm mostrado que eles podem participar do processo de detecção e funcionar como componentes ativos de imobilização. Os filmes usados nestes sensores devem ser capazes de espalhar o potencial elétrico produzido pela reação bioquímica para o transdutor de forma eficiente, para garantir a reprodutibilidade (SITUMORANG ET AL, 1998). A utilização dos filmes poliméricos nanométricos garante uma maior sensibilidade e medições rápidas, incentivando, assim, o desenvolvimento de novos filmes de polímeros de naturezas químicas variadas. Outros estudos indicam que os monômeros que contêm grupos aromáticos ligados a oxigênio são mais fáceis de polimerizar.

A síntese destes polímeros é reprodutível e os filmes têm boa resistência mecânica, o que permite uma maior estabilidade ao eletrodo modificado (ABRAHÃO JR ET AL, 2013).

As vias de polimerização da tiramina-[4-(2-aminoetil) fenol] têm sido estudadas visando aplicação como suporte para biossensores. Este composto possui uma porção amino separada do anel fenólico, o qual é composto por uma hidroxila ligada a um anel aromático, por dois grupos de metileno (Figura8), sendo que somente a porção de fenol pode ser oxidada para se realizar a polimerização (EHSANI ET AL, 2014). Tanto o grupo amino quanto a hidroxila da tiramina são doadores de elétrons, o que causa um efeito ressonante no anel aromático, promovendo uma maior liberdade conformacional do polímero. O uso do meio aquoso ácido para a produção de poli-[4-(2-aminoetil) fenol], poli-Tyr, permite a formação de filmes ultrafinos com melhores propriedades condutoras do que as obtidas em soluções neutras ou alcalinas, devido às suas hidroxilas livres. A porção amino do polímero pode ser utilizada para ligar a moléculas orgânicas ou biomoléculas de interesse, podendo, por exemplo, ligar-se covalentemente por meio de uma carboxiamida (EHSANI ET AL, 2014, ABRAHÃO JR ET AL, 2013).

**Figura 8:** Esquema mostrando o monômero de tiramina (a) e a politiramina (b).



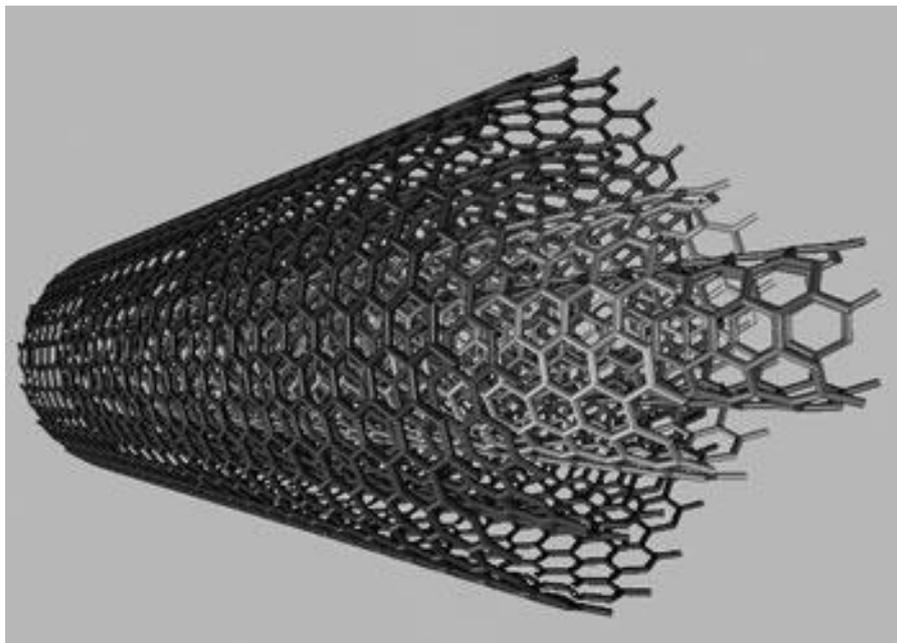
**Fonte:** Adaptado de EHSANI ET AL (2014).

### 2.4.2. Nanotubos de Carbono

Os nanomateriais têm pelo menos uma de suas dimensões físicas entre 1 e 100 nm ( $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$ ) e ao ter seu tamanho reduzido para a escala nanométrica, alguns materiais podem adquirir propriedades únicas, porque passam a predominar os fenômenos de superfície sobre os fenômenos físicos e químicos encontrados na escala macroscópica, os habilitando a novas aplicações. O uso de nanomateriais pode levar a um aumento da área da superfície do eletrodo, melhorando a eficácia da imobilização de moléculas biológicas e, por conseguinte, a sensibilidade do dispositivo (JUBETE ET AL., 2009).

Dentre estes nanomateriais, os Nanotubos de Carbono (NTCs) têm despertado grande interesse na comunidade científica nas últimas décadas. Estes são um novo tipo de material de carbono, conseguidos devido à torção de folhas de grafeno em cilindros de carbono, com os átomos de carbono ligados de forma covalente aos seus vizinhos. Eles possuem duas dimensões nanométricas (espessura e diâmetro), seu comprimento podendo chegar a  $50\ \mu\text{m}$ . Podem ser compostos de uma única folha de grafeno (single-walled carbon nanotubes - SWCNTs) ou várias folhas (multi-walled carbon nanotubes - MWNTs) (Figura 9) (GOMES-FILHO ET AL., 2012; WANG ET AL, 2003).

**Figura 9:** Nanotubo de carbono de múltiplas paredes.



**Fonte:** HERBST ET AL (2004).

Os NTCs têm se mostrado muito promissores para o desenvolvimento de aplicações tecnológicas inovadoras, tais como baterias, ponteiras para microscopia de varredura por sonda, sensores, dentre outros. Reúnem propriedades como aumento da cinética de transferência elétrica, possibilidade de servirem como âncoras de biomoléculas, aumento da transferência de cargas. Além disso, aumentam a taxa de reação de muitas espécies eletroativas e diminuem o tempo de resposta do eletrodo, podendo, com isso alcançar alta sensibilidade com baixos limites de detecção (GOMES-FILHO ET AL., 2012; SOUZA-FILHO, FAGAN, 2007; HERBST ET AL, 2004).

Estes têm sido amplamente utilizados na área de biossensores devido às suas exclusivas características eletrônicas, metálicas e estruturais, como condutância elétrica, alta rigidez mecânica e a possibilidade de funcionalizar os nanotubos de carbono a fim de alterar as suas propriedades intrínsecas. Há duas formas principais de funcionalização dos nanotubos de carbono: funcionalização covalente e não covalente. A funcionalização não covalente é baseada em forças de Van der Waals e controlada pela termodinâmica, alterando a natureza da superfície dos nanotubos sem alterar sua estrutura. A desvantagem deste método é a fraca força de ligação entre os NTCs e o grupamento funcionalizante. Por isso funcionalizações covalentes não as mais utilizadas comercialmente (GOYANES ET AL, 2007; PENG ET AL, 2003).

Um dos métodos de funcionalização covalente mais utilizado para carboxilação dos nanotubos é a oxidação da parede envolvendo um tratamento ultrassônico extensivo em uma mistura de ácido nítrico concentrado e ácido sulfúrico. Isto possibilita a formação de orifícios na parede dos nanotubos e concomitante liberação de dióxido de carbono. O produto final são nanotubos nos comprimentos de 100 a 300 nm com paredes laterais com considerável quantidade de grupos contendo oxigênio, principalmente grupos carboxil. Estes são sítios úteis para outras modificações, pois permitem a ligação covalente de moléculas (BALASUBRAMANIAN, BURGHARD, 2005; WONG ET AL, 1998).

### 3. JUSTIFICATIVA

A transfusão de sangue e hemoderivados é uma prática rotineira em casos de urgência e emergência onde há perda de elevada quantidade de sangue do paciente, esta perda podendo levar o mesmo ao choque hipovolêmico e possivelmente à morte. No entanto, o sangue também é um meio carreador de diversos agentes biológicos e parasitários capazes de causar uma vasta gama de doenças de alta morbimortalidade.

Devido a isso, o controle e a fiscalização de bolsas de sangue e hemoderivados precisa ser extremamente rígida. Todas as bolsas de sangue passam por uma extensa bateria de testes na intenção de detectar tais agentes etiológicos. Entretanto, estes testes são feitos apenas após a coleta do sangue e podem levar horas, ou até mesmo dias até a obtenção dos seus resultados. Quando contaminadas essas bolsas precisam ser descartadas, causando grande prejuízo para o Sistema Único de Saúde (SUS).

No Brasil, a Hepatite B se encontra entre os principais causadores de descarte de bolsas de sangue, visto que em um terço dos casos a sua fase aguda é assintomática, levando pacientes a doar sem o conhecimento de sua condição. Com isso, é de grande importância a busca por alternativas diagnósticas sensíveis e rápidas para serem usadas na pré-triagem de doadores de sangue em bancos de hemoderivados de modo a reduzir os altos custos com o descarte de bolsas de sangue.

## **4. OBJETIVOS**

Desenvolver um método de detecção rápida de anti-HBc a partir de antígenos do HBc (HBcAg) para uso em triagem de doadores de sangue em bancos de hemoderivados.

### **4.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1.1. Estudar as propriedades do filme polimérico;
- 4.1.2. Ativar e imobilizar os nanotubos de carbono;
- 4.1.3. Estudar a estabilidade da matriz NTC/filme;
- 4.1.4. Imobilizar os antígenos;
- 4.1.5. Testar a estabilidade da ligação antígeno/matriz;
- 4.1.6. Caracterizar a plataforma sensora;
- 4.1.7. Determinar a curva de calibração;
- 4.1.8. Testar repetitividade e reprodutibilidade;
- 4.1.9. Aperfeiçoar os parâmetros de uso do biossensor (pH, concentração).

## 5. METODOLOGIA

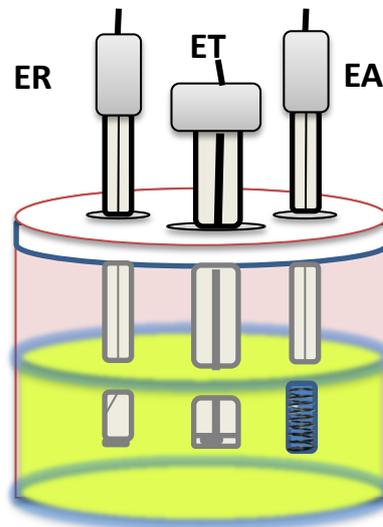
### 5.1. REAGENTES

Os nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos (NTC-COOH) foram adquiridos da Dropsens, Llanera (Asturias), Spain. O HBcAg e o anti-HBc foram adquiridos da Abcam Plc, Cambridge, Inglaterra. Tiramina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA. As demais soluções, como Tampão PBS, ácido sulfúrico, ferricianeto e ferrocianeto de potássio e todas as outras foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q), Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha.

### 5.2. EQUIPAMENTOS E MEDIÇÕES

Os testes eletroquímicos foram feitos em um sistema trieletródico (Figura 10) contendo um eletrodo auxiliar (EA) helicoidal de platina, um eletrodo de referência (ER) de Ag/AgCl (sat. KCl) e um eletrodo de trabalho de ouro (EAU), em uma célula de vidro fechada, conectados a um potenciostato/galvanostato IviumCompactStat (Eindhoven, Netherlands) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software IviumSoft. Voltametria Cíclica (VC), com os potenciais de 0,6 a 1,35 mV (após a polimerização da tiramina), foi executada para acompanhar cada etapa de modificação da superfície do eletrodo de trabalho. Voltametria de Onda Quadrada, com os potenciais de 1 a 0 mV, de foi executada para avaliar as etapas de resposta analítica da matriz. As medições de voltametria foram efetuadas em solução tanto de KCl apenas ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) como contendo também  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  como sonda redox.

**Figura 10:** Representação de um sistema trieletródico.



Fonte: SILVA (2014).

### 5.3. MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA

#### 5.3.1. Polimerização da tiramina

Primeiramente foi realizada a limpeza manual do eletrodo de trabalho de ouro com alumina  $0,3\mu$  e em seguida a lavagem com água destilada. Foram feitas várias diluições de tiramina - 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  - em solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A eletropolimerização do filme de tiramina foi realizada por voltametria cíclica durante dez ciclos de voltametria com potencial de -0,1 a 1,05 V. As diluições do monômero foram testadas para obtenção da curva de concentração, onde foi determinada a concentração ótima a ser usada. As fases analíticas posteriores à polimerização da tiramina foram realizadas em solução de KCl a  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  apenas.

#### 5.3.2. Deposição dos nanotubos de carbono

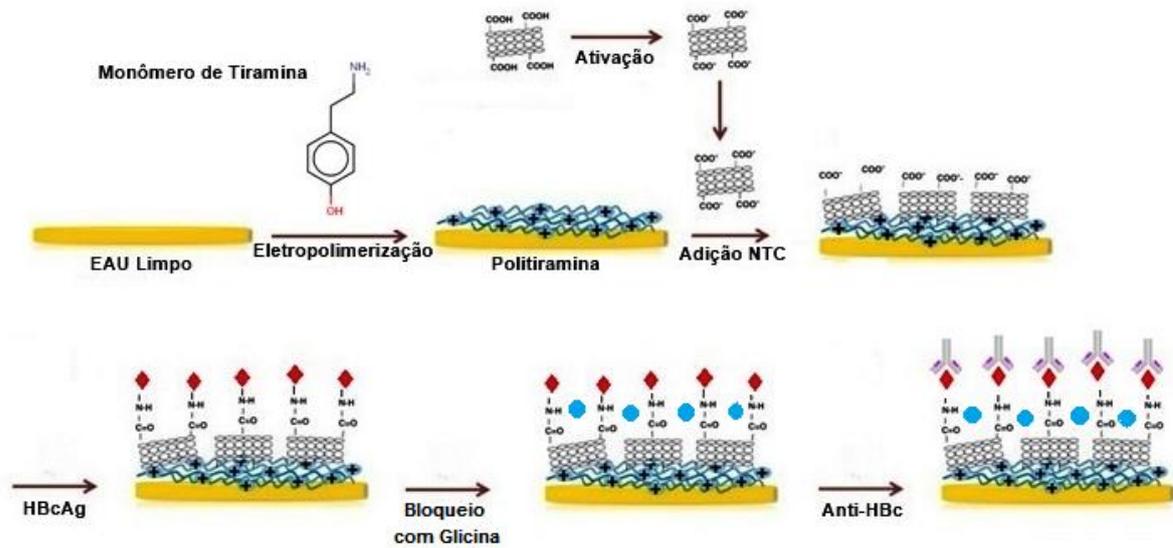
A dispersão dos nanotubos de carbono (1mg) foi realizada em 1 mL de dimetilformamida (DMF) através de banho de ultrassom por duas horas, até a obtenção de uma solução homogênea. Os NTCs dispersados tiveram seus sítios carboxílicos por meio de uma solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) nas concentrações de 20 e  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente, e na proporção de

1:1 de nanotubos e EDC/NHS. Após a obtenção do filme de tiramina foi feita deposição dos NTCs sobre o eletrodo através do gotejamento de 10 $\mu$ L da solução obtida. Foi feito o teste de período de ativação dos nanotubos, deixando a solução NTC/EDC/NHS sobre o eletrodo por tempos variados – 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos -, levando então o mesmo para a estufa para evaporação do solvente.

#### **5.4. RESPOSTA ANALÍTICA**

O HBcAg foi imobilizado na superfície do eletrodo nanoestruturado com a matriz filme/NTC através da incubação de 10 $\mu$ L de uma solução do antígeno a 100  $\mu$ g/mL preparado em água ultrapura (Milli-Q) sobre a área do eletrodo por uma hora. O bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos foi realizado através da incubação de solução de glicina a 50 mmol L<sup>-1</sup> em tampão PBS por uma hora. Foram realizados os testes de resposta analítica com concentrações de 0,1 e 1,0 ng/mL do anti-HBc preparado em tampão PBS em pH 7,4 para simular o pH sanguíneo, onde 10 $\mu$ L do anticorpo foram incubados na superfície do eletrodo na presença do antígeno por meia hora a cada incubação. Na Figura 11 são mostradas as etapas realizadas para obtenção da plataforma sensora. Foram feitos os testes com a concentração de 0,1 ng/mL para obtenção do limite inferior de resposta linear e com 1,0 ng/mL para obtenção do limite de saturação do anticorpo e comparação com os testes rápidos vendidos comercialmente (como, por exemplo, o Hepatitis Test, World of Health Biotech Co., Ltd. - Beijing, China).

**Figura 11:** Esquema exibindo as etapas de construção da plataforma imunossensora e imunoensaio.



Fonte: TRINDADE (2015).

Após a obtenção da curva de resposta foram feitos testes de repetitividade e reprodutibilidade para avaliar a resposta com relação aos erros manuais e de pipetação. O teste de repetitividade foi feito avaliando-se a resposta em um mesmo eletrodo vinte vezes e calculando-se o coeficiente de variação nas medidas. A reprodutibilidade foi avaliada fazendo-se a medida da resposta em oito eletrodos diferentes sob as mesmas condições, sendo o coeficiente de variação feito dos valores obtidos com a resposta de corrente determinada pela seguinte equação:

$$\Delta I\% = \frac{I_F - I_I}{I_I}$$

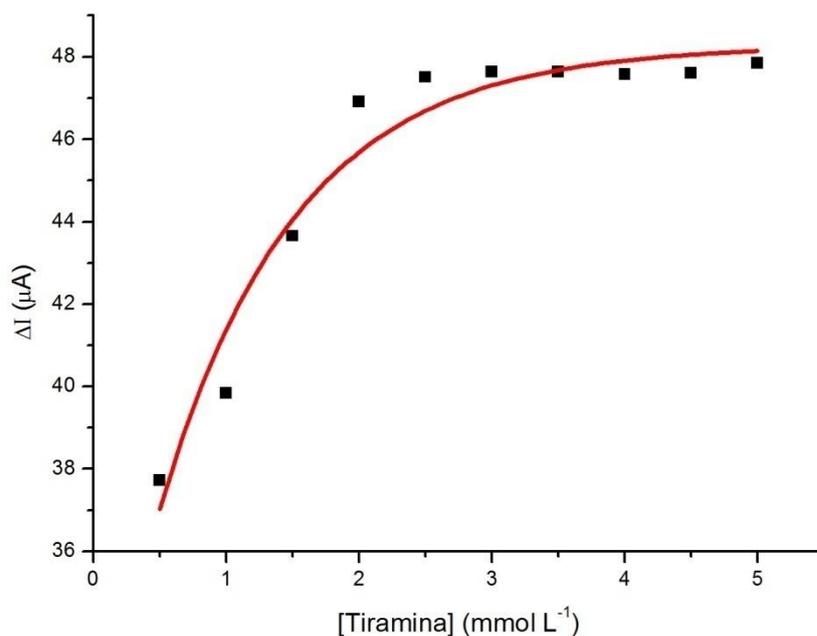
Onde  $\Delta I\%$  é o valor final utilizado para o cálculo do coeficiente de variação,  $I_F$  é o valor de corrente depois da incubação do anticorpo e  $I_I$  é o valor de corrente antes da incubação do anticorpo, visto que os valores de base de eletrodos diferentes podem variar.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1.EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TIRAMINA

A curva de concentração obtida com as diferentes diluições de tiramina (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 mmol L<sup>-1</sup>) indica que após a concentração de 2,5 mmol L<sup>-1</sup> é atingido um platô, no qual a diferença de corrente permanece quase constante, demonstrando que após esta concentração há saturação na oferta de monômeros para eletropolimerização. Por isto esta concentração (2,5 mmol L<sup>-1</sup>) foi adotada para fases posteriores do trabalho (Figura 12).

**Figura 12:** Curva de concentração da tiramina com valores de concentração de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 mmol L<sup>-1</sup>.



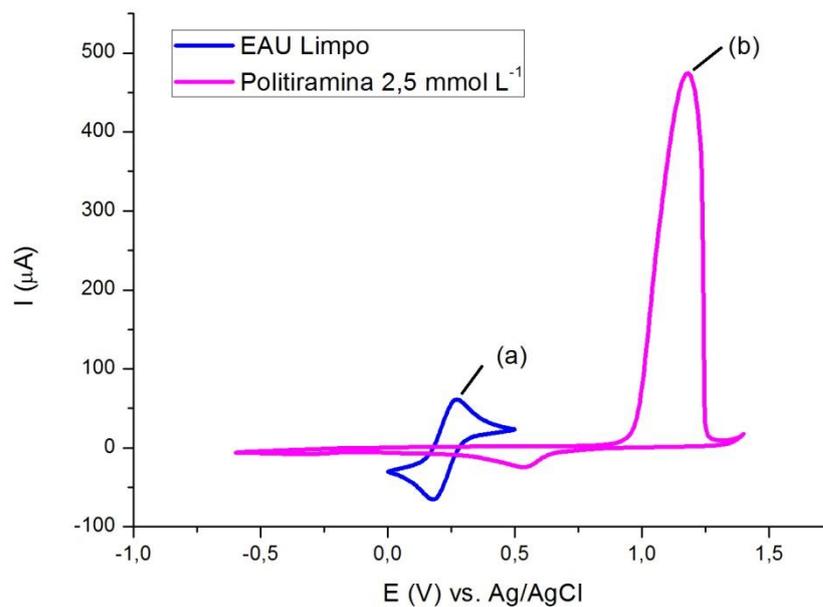
Fonte: TRINDADE (2015).

Após a eletropolimerização da tiramina, em comparação ao eletrodo limpo (Figura 13), foi observado um aumento de 88% na área eletroativa, calculado de acordo com a equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) A D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C$$

Onde  $I_p$  é o valor do pico de corrente,  $A$  representa a área eletroativa do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão da sonda redox ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvido na reação redox,  $v$  é potencial da velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ) e  $C$  é a concentração da molécula desejada na solução.

**Figura 13:** Voltamogramas cíclicos mostrando o eletrodo limpo (a) e o eletrodo após a polimerização da tiramina (b).



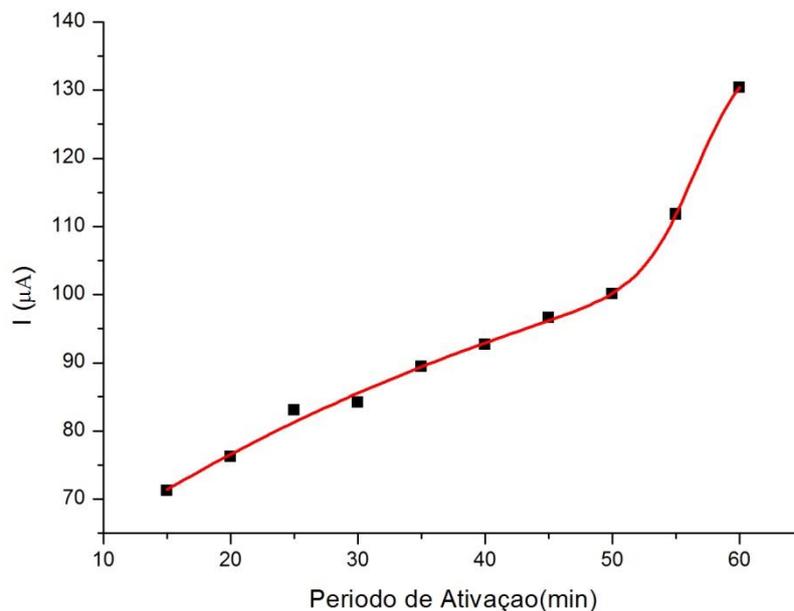
**Fonte:** TRINDADE (2015).

Este aumento se deve à relativa condutividade do filme, devido à ressonância de seu anel aromático, efeito potencializado quando a polimerização é realizada em ácido. A resposta do filme foi observada em solução aquosa de  $\text{KCl}$   $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , garantindo que os picos oxidação e redução observados em 1,2 e 0,6 V respectivamente, devem-se à oxidação e redução da tiramina, uma vez que a solução de  $\text{KCl}$  é considerada inerte eletroquimicamente. Isto é de grande importância, visto que os eletrólitos presentes no sangue estão mais próximos quimicamente de uma solução de  $\text{KCl}$  do que de uma solução como a sonda redox utilizada na maioria dos estudos eletroquímicos com imunossensores, garantindo, assim, uma maior coerência entre os resultados experimentais e os resultados clínicos.

## 6.2. MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA

O estudo do período de ativação dos NTCs demonstrou que a corrente aumenta com o tempo de incubação. O perfil encontrado segue um modelo de curva sigmoidal (Figura 14). Períodos de ativação de uma hora foram considerados ideais, devido ao proporcional aumento da área eletroativa. Este fenômeno acontece provavelmente devido aos grupamentos carbodiimida presentes tanto no EDC quanto no NHS, os quais podem promover a ativação dos sítios carboxílicos dos NTCs devido à formação de um intermediário, a O-acilisourea, que é facilmente deslocado por grupos amino primários durante a reação. Com isso, a amina primária forma uma ligação amida com o grupo carboxílico e o subproduto do EDC é liberado como um derivado solúvel da ureia. O NHS é normalmente utilizado em conjunto com o EDC para criar intermediários mais estáveis, já que a O-acilisourea é muito reativa. O NHS forma um éster mais estável, permitindo a conjugação da amina com o grupamento carboxílico em pH fisiológico (NICOLINI, 2013).

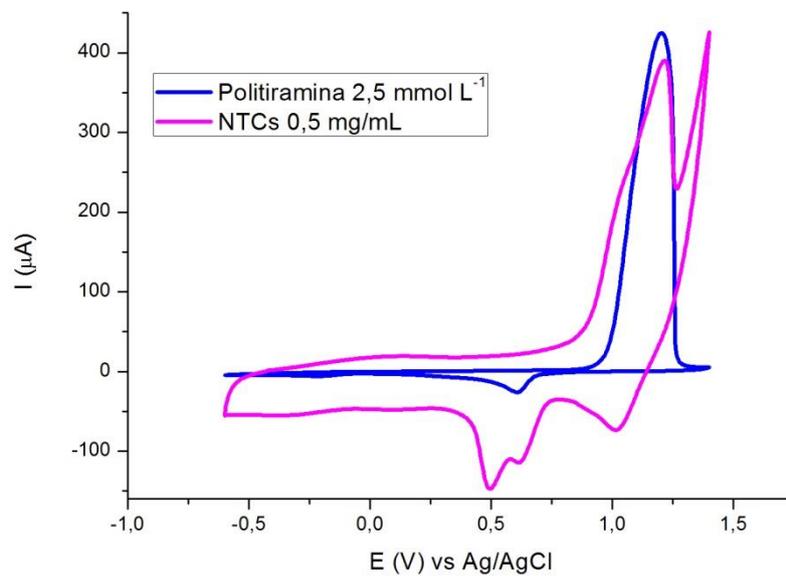
**Figura 14:** Curva de tempo de ativação dos nanotubos em EDC/NHS com tempos variando de 15 a 60 minutos.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

A deposição dos nanotubos sobre a tiramina resultou em um aumento de 87% da área eletroativa (Figura 15) em solução de KCl, calculado através da equação de Randles-Sevcik anteriormente mencionada. Observando-se a corrente de redução, um grande pico aparece por volta de 0,5 V. Como os componentes sanguíneos são mais propensos à oxidação, o pico de redução foi escolhido para observação das etapas seguintes por VOQ.

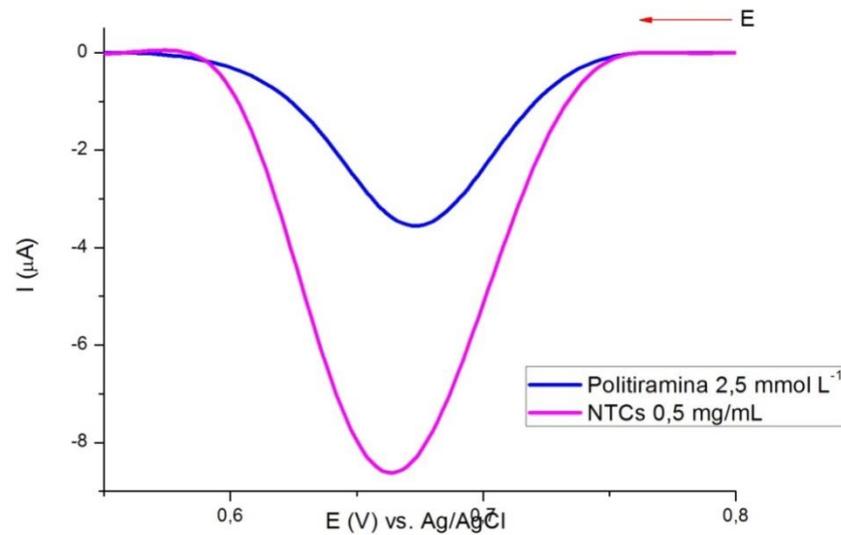
**Figura 15:** Aumento da área eletroativa após deposição de nanotubos de carbono ativados com EDC/NHS sobre filme de politiramina.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

Observando-se o gráfico da VOQ (Figura 16) do eletrodo antes e depois da adição dos NTCs percebeu-se um aumento médio de aproximadamente 85% do pico de redução com relação ao eletrodo apenas com o filme de politiramina.

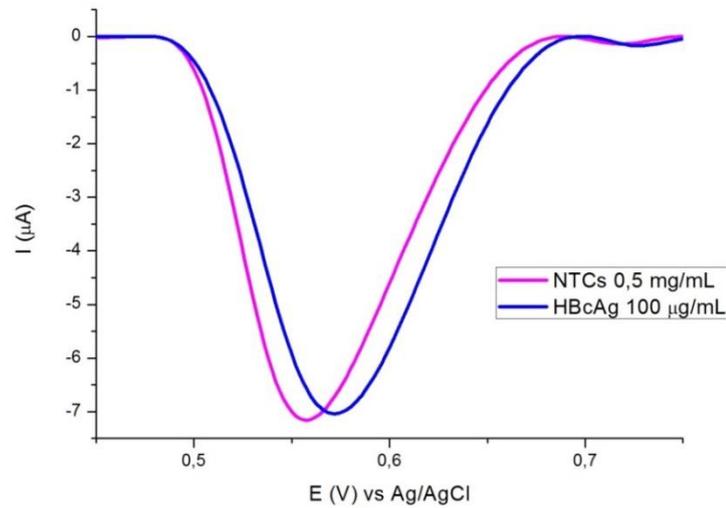
**Figura 16:** Gráfico de Voltametria de Onda Quadrada demonstrando os picos apenas com o filme de politiramina e após a adição dos nanotubos.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

A adição de HBcAg e sua presença foi verificada utilizando a VOQ. (Figura 17). A imobilização do antígeno causou um deslocamento no potencial do pico catódico com relação ao pico com os nanotubos de carbono, passando de 0,55 a 0,57  $\text{V}$ . Alguns antígenos, como o HBcAg, possuem uma certa densidade de cargas em sua estrutura, o que pode ocasionar este fenômeno (ERDMANN, 2013).

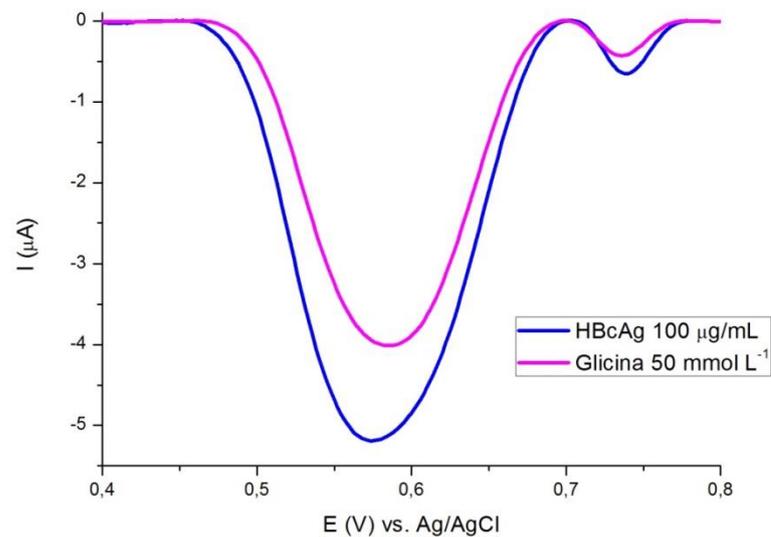
**Figura 17:** Alteração no potencial do pico de redução após a adição de HBcAg.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

Com a adição de glicina, observada através de VOQ (Figura 18), houve uma redução média de 22,5% do pico com relação ao antígeno apenas, o que pode demonstrar o bloqueio dos sítios carboxílicos livres. A presença de sítios amino livres na molécula de glicina proporciona esta ligação, o que se torna importante para evitar ligações amida inespecíficas com o anticorpo ou substâncias presentes na amostra (ZERAVIK ET AL, 2010)

**Figura 18:** Redução do pico de corrente após a adição de glicina.

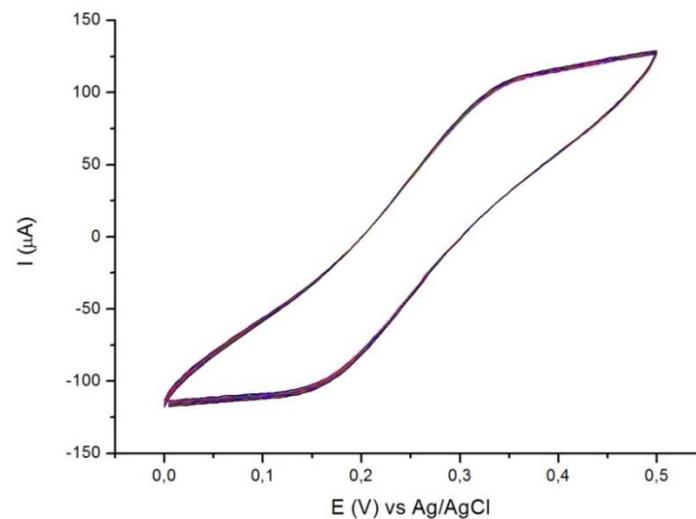


**Fonte:** TRINDADE (2015).

### 6.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE E MECANÍSTICOS

De acordo com o gráfico de estabilidade da matriz de politiramina com NTCs (Figura 19) foram calculados os desvios padrão e os coeficientes de variação para os picos de oxidação e redução dos 15 ciclos de VC aplicados na matriz em sonda redox ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ).

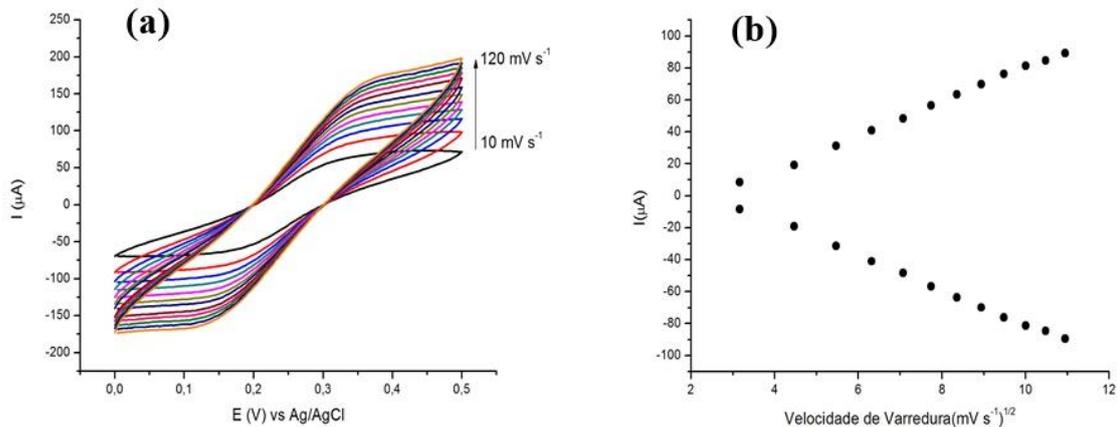
**Figura 19:** VCs mostrando estabilidade da matriz de politiramina com nanotubos de carbono após 15 ciclos consecutivos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** TRINDADE (2015).

O teste de velocidade de varredura realizado com ciclos de VC com velocidades variando de  $10$  a  $120 \text{ mV s}^{-1}$  (Figura 20 (a)) demonstrou uma simetria proporcional dos picos de oxidação e redução, podendo concluir que o processo ocorrido é reversível. Ambos os picos aumentaram linear (com coeficiente de correlação linear  $r = 0,998$ ) e proporcionalmente à raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 20 (b)), demonstrando que o processo é controlado por difusão (SILVA ET AL, 2014).

**Figura 20:** a) Voltamogramas cíclicos nas velocidades de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120  $\text{mV s}^{-1}$  (de dentro para fora); (b) Variação os picos de corrente com relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.

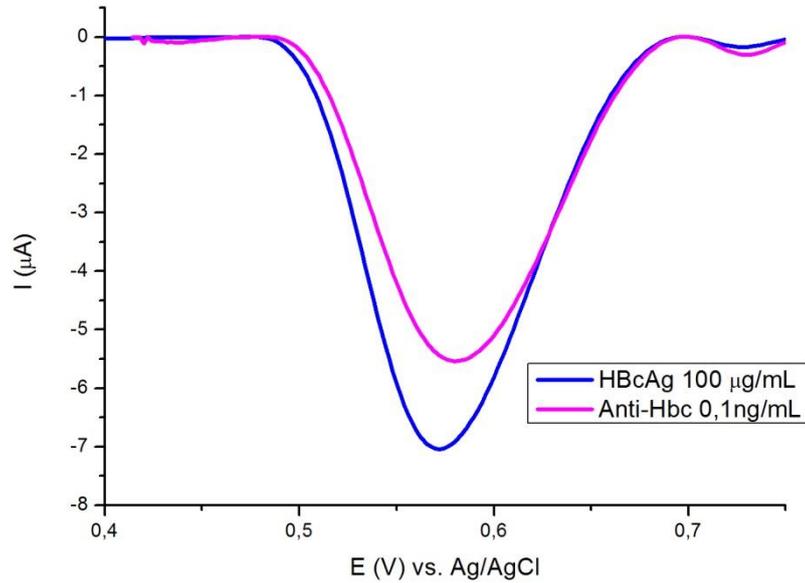


Fonte: TRINDADE (2015).

#### 6.4. RESPOSTA ANALÍTICA

Observando-se gráficos de VOQ (em KCl a  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) antes e depois da incubação de anti-HBc por 30 minutos (Figura 21), obteve-se uma redução média de aproximadamente 22% do gráfico após a incubação de  $0,1 \text{ ng/mL}$  do anti-HBc na presença do HBcAg na concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$  (com bloqueio de glicina a  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo este o limite inferior de resposta linear obtido para a matriz. Isso pode demonstrar uma maior sensibilidade da matriz com relação ao teste rápido citado anteriormente (Hepatitis Test, World of Health Biotech Co., Ltd. - Beijing, China), o qual demonstra limite mínimo de detecção de  $2,0 \text{ ng/mL}$ .

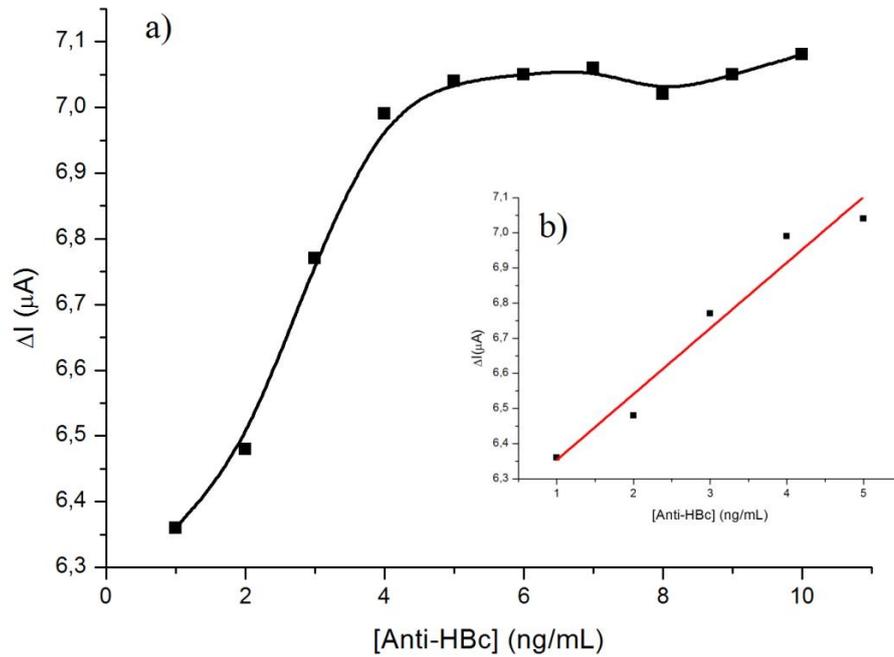
**Figura 21:** Efeito da adição de 0,1 ng/mL de anti-HBc sobre o VOQ da matriz de imobilização na presença de 100µg/mL de HBcAg.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

A curva analítica de resposta realizada após sucessivas incubações de solução de anti-HBc (1,0 ng/mL) durante 30 minutos mostrou a formação de um platô após a 5<sup>a</sup> incubação (Figura 22 (a)), demonstrando saturação do imunossensor. A faixa linear de resposta do imunossensor (Figura 22 (b)) foi de 1,0 – 5,0 ng/mL de anti-HBc com  $r=0.945$ , mostrando equivalência com os testes rápidos comerciais citados anteriormente.

**Figura 22:** (a) Curva de limite de detecção de 1-10ng/mL do anti-HBc com valores obtidos no potencial de 0,5 V; (b) Faixa linear de detecção de 1-5ng/mL.



**Fonte:** TRINDADE (2015).

O teste de repetitividade demonstrou coeficiente de variação de 1% num mesmo eletrodo sobre mesmas condições após vinte medidas consecutivas. A reprodutibilidade obtida foi de 6% em oito eletrodos, sendo esta porcentagem de erro considerada dentro da faixa ideal, entre 1 e 10%, demonstrando a confiabilidade da matriz (PEDOTT, FOGLIATO, 2011).

## 6. CONCLUSÕES

O uso do HBcAg para detecção do anti-HBc é uma das grandes vantagens deste trabalho, visto que este é um dos primeiros marcadores a aparecer quando da infecção do paciente, e permanece por toda a vida do mesmo. Visto que a maioria dos biossensores voltados para detecção do HBV utiliza o anti-HBs, temos a vantagem de utilizar um marcador já considerado mais eficaz nos imunoenaios.

Outro diferencial foi o uso da politiramina, que permitiu a ausência da sonda redox para os testes de resposta analítica. Isto permite um resultado mais próximo da realidade, visto que a solução de KCl utilizada para a resposta analítica é mais semelhante aos eletrólitos do sangue total ou do soro do que a sonda redox utilizada na maioria dos imunossensores.

O conjunto do polímero com os nanotubos de carbono permitiu uma grande área para imobilização dos antígenos, garantindo uma maior sensibilidade da matriz, obtendo-se um limite inferior de detecção de 0,1 ng/mL, bem inferior aos testes rápidos encontrados no mercado (com limite inferior de detecção na faixa de 1 a 2 ng/mL).

Para os testes de VOQ, foi possível utilizar a corrente de redução para observar a resposta analítica, o que é mais uma vantagem frente a outros imunossensores, visto que os componentes do sangue possuem uma maior tendência a se oxidar, diminuindo, assim, a possibilidade de haver substâncias no sangue capazes de interferir na medida a ser feita.

Para finalizar, então, temos que a matriz desenvolvida neste trabalho demonstrou grande sensibilidade, boa reprodutibilidade e estabilidade, sendo confiável e com possibilidade de reversibilidade do processo. Esta pode ser comparada com outros testes rápidos existentes, tendo obtido limite de detecção menor do que o encontrado no mercado. O fato de dispensar equipamentos sofisticados como imunoanalisadores (ou leitores de ELISA) torna mais econômico com relação aos testes bioquímicos laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

1. ABRAHÃO JR., O.; MACHADO, A. E. H.; SILVA, F. F. S.; MADURRO, J. M.; CASTRO, C. M.; SONODA, M. T. **Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study.** Journal of Molecular Structure, 200–208, 2013.
2. ALIPOUR, E.; GHOURCHIAN, H.; BOUTORABI, S. M. **Gold nanoparticle based capacitive immunosensor for detection of hepatitis B surface antigen.** Analytical Methods, 4448-4453, 2013.
3. ALVARIZ, R. C. **Hepatite crônica pelo vírus B (HBV).** Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, 16-34, 2006.
4. ANDRADE, V. M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
5. BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. **Chemically functionalized carbon nanotubes.** Small, 180 –192, 2005.
6. BARONE, A. A. **Hepatite crônica pelo vírus B: O ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B.** São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 6-10, 2008.
7. BORISOV, S. M.; WOLFBEIS, O. S. **Optical biosensors.** Chem. Rev., 423-461, 2008.
8. BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A.; EMER, L. F. **Diagnóstico da hepatite na prática médica: revisão da literatura.** Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health, 161-168, 2001.
9. BRUIX, J.; SHERMAN, M. **Management of hepatocellular carcinoma: An update.** Hepatology, 1020-1022, 2011.
10. CASTELO A.; PESSÔA M. G.; BARRETO T. C. B. B.; ALVES, M. R. D.; ARAÚJO, D. V. **Estimativas de custo da hepatite B crônica no Sistema Único de Saúde brasileiro em 2005.** Rev Assoc Med Bras, 486-491, 2007.

11. CASTRO, A. C. H.; FRANÇA, E. G.; PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. **Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B vírus.** Applied Surface Science, 273–279, 2014.
12. CONTE, V. P. **Carcinoma hepatocelular. Parte 1: Considerações gerais e diagnóstico.** Arq. Gastroenterology, 59-68, 2000.
13. DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. **A SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip.** Clinica Chimica Acta, 114-120, 2007.
14. EHSANI, A.; ADELI, S.; BABAEI, F.; MOSTAANZADEH, H.; NASROLLAHZADEH, M. **Electrochemical and optical properties of TiO<sub>2</sub> nanoparticles/poly tyramine composite film.** Journal of Electroanalytical Chemistry, 91–97, 2014.
15. ERDMANN, C. A. **Desenvolvimento de sensores bioeletroquímicos para o diagnóstico de doenças infecciosas humanas.** Programa de pós-graduação em química aplicada, UEPG, 2013.
16. FERREIRA, M. F. **Diagnóstico e tratamento da hepatite B.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 389-400, 2000.
17. FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. **Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B.** R. Soc. Bras. Med. Trop., 451-462, 2007.
18. FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. **Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.** Química Nova, 381-389, 2003.
19. GANEM, D.; PRINCE, A. M. **Hepatitis B virus infection - Natural history and clinical consequences.** The New England Journal of Medicine, 1118-1129, 2004.
20. GIAROLA, V. M. **Ressonância de plasmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis.** Universidade Federal de Itajubá, Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Dissertação de Mestrado, 2007.

21. GOMES-FILHO, S. L. R.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, M. M. S.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. **A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiotroponin T.** *Microchemical Journal*, 13-010, 2012.
22. GOYANES, S.; RUBIOLO, G. R.; SALAZAR, A.; JIMENO A.; CORCUERA, M. A.; MONDRAGON, I. **Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy.** *Diamond & Related Materials*, 412–417, 2007.
23. HARRIS, R.; GONIN, R.; ALTER, H. J.; WRIGHT, E. C.; BUSKELL, Z. J.; HOLLINGER, F. B.; SEEFF, L. B. **The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse.** *Annals of Internal Medicine*, 102-124, 2001.
24. HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. **Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar.** *Química Nova*, 986-992, 2004.
25. HWANG, E. W.; CHEUNG, R. **Global epidemiology of hepatitis B virus (HBV) infection.** *North American Journal of Medicine and Science*, 7-13, 2011.
26. IIDA, V. H.; SILVA, T. J. A.; SILVA, A. S. F.; SILVA, L. F. F.; ALVES, V. A. F. **Cirrose hepática: Aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo concentrado em necropsias.** *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*, 29-36, 2005.
27. IONESCU, R. E.; GONDRAN, C.; BOUFFIER, L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S. **Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine.** *Electrochimica Acta*, 6228-6232, 2010.
28. JIN, Y.; YAO X; LIU Q.; LI, J. **Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator.** *Biosensors and Bioelectronics*, 1126-1130, 2006.
29. JUBETE, E.; LOAIZA, O. A.; OCHOTECO, E.; POMPOSO, J. A.; GRANDE, H.; RODRÍGUEZ, J. **Nanotechnology: a tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors.** *Journal of Sensors*, 1-13, 2009.

30. KIRSCH, J; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. **Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine.** Chem. Soc. Rev., 8733-8768, 2013.
31. KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry.** Marcel Dekker Inc., Second Edition, 1996.
32. KWON, S. Y.; LEE, C. H. **Epidemiology and prevention of Hepatitis B Virus infection.** The Korean Journal of Hepatology, 87-95, 2011.
33. LOJOU, É.; BIANCO, P. **Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices.** J. Electroceram., 79-91, 2006.
34. LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. **Aspectos gerais da hepatite B.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, 337-344, 2011.
35. LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. **Biosensor technology: technology push versus market pull.** Biotechnology Advances, 492-500, 2008.
36. LUPPA, P. L.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. **Immunosensors: principles and applications to clinical chemistry.** Clinica Chimica Acta, 1-26, 2001.
37. MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. **Fiber optic biosensor: an overview.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 664-683, 2002.
38. MEHRVAR, M; ABDI, M. **Recent developments, characteristics and potential applications of electrochemical biosensors.** Analytical Sciences, 113-1126, 2004.
39. MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor.** Tese de doutorado, Campinas, 2006.
40. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hepatites virais: O Brasil está atento.** 2005.
41. MIRANDA, L. V. G.; PASSOS, A. D. C.; FIGUEIREDO, J. F. C.; GASPAR, A. M. C.; YOSHIDA, C. F. T. **Marcadores sorológicos de hepatite B em indivíduos submetidos a exames de sangue em unidades de saúde.** Revista de Saúde Pública, 286-291, 2000.

42. NICOLINI, J. V. **Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção do peróxido de hidrogênio.** Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, UFRJ, 2013.
43. OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. **Square Wave Voltammetry.** Analytical Chemistry, 101-110, 1985.
44. PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. **Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications.** Biosensors and Bioelectronics, 1349-1356, 2003.
45. PEDOTT, A. H.; FOGLIATTO, F. S. **Estudo de repetitividade e reprodutibilidade para dados funcionais.** XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Belo Horizonte, MG, 2011.
46. PELIÇÃO, F. S. **Avaliação custo-efetividade da utilização de um teste rápido para pesquisa de anticorpos contra o *core* do vírus da Hepatite B (Anti-HBC) na triagem de doadores de sangue em serviços de hemoterapia.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde, UFES, 2007.
47. PENG, H.; ALEMANY, L. B.; MARGRAVE, J. L.; KHABASHESKU, V. N. **Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes.** American Chemical Society, 15174-15182, 2003.
48. PERZ, J. F.; ARMSTRONG, G. L.; FARRINGTON, L. A.; HUTIN, Y. J. F.; BELL, B. P. **The contributions of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.** Journal of Hepatology, 529-538, 2006.
49. RAMALEY, L.; KRAUSE JR., M. S. **Theory of Square Wave Voltammetry.** Analytical Chemistry, 1362-1365, 1969.
50. REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. **Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus infection.** Nature, 216-229, 2005.

51. RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. **Imunossensor amperométrico.** QUÍMICA NOVA, 316-320, 2002.
52. SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. **Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques.** Biosensors and Bioelectronics, 2749-2765, 2009.
53. SALLES, N. A.; SABINO, E. C.; BARRETO, C. C.; BARRETO, A. M. E.; OTANI, M. M.; CHAMONE, D. F. **Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.** Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health, 111-116, 2003.
54. SILVA, M. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, B. V. M.; GOMES-FILHO, S. L. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F.; DUTRA, R. F. **Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1-7,2014.
55. SITUMORANG, M.; GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B.; BARNETT, D. **Electrodeposited polytyramine as an immobilisation matrix for enzyme biosensors.** Biosensors & Bioelectronics, 953–962, 1998.
56. SOUSA E SILVA, I. S. **Cirrose hepática.** Cadernos de Gastroenterologia, 111-120, 2010.
57. SOUTO, F. J. D.; ESPÍRITO SANTO, G. A.; PHILIPPI, J. C.; PIETRO, B. R. C.; AZEVEDO, R. B.; GASPAR, A. M. C. **Prevalência e fatores associados a marcadores do vírus da hepatite Bem população rural do Brasil central.** Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health, 388-394, 2001.
58. SOUZA-FILHO, A. G.; FAGAN, S. B. **Funcionalização de nanotubos de carbono.** Quim. Nova, 1695-1703, 2007.
59. TANG, D.P.; YUAN, R.; CHAI, Y.Q., ZHONG, X.; LIU, Y.; DAI, J.Y.; ZHANG, L.Y. **Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method** Analytical Biochemistry, 345–350, 2004.

60. THUSU, R. **Strong growth predicted for biosensors market, 2010**. Disponível em: <<http://www.sensorsmag.com/specialty-markets/medical/strong-growth-predicted-biosensors-market-7640>>, Acesso em: 09 de Novembro de 2014.
61. TURNER, A. P. F. **Biosensors: sense and sensibility**. Chemical Society Reviews, 3175–3648, 2013.
62. UBIALI, E. M. A.; SAMPAIO, D. A.; PINHO, P. F.; COVAS, D. T. **Custo médio do módulo de coleta de sangue total pelo método ABC**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 213-217, 2008.
63. VELASCO-GARCIA, M. N. **Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects**. Seminars in Cell & Developmental Biology, 27-33, 2009.
64. WANG, J. **Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics**. Biosensors and Bioelectronics, 1887–1892, 2006.
65. WANG, S.; MAMEDOVA, N.; KOTOV, N. A.; CHEN, W.; STUDER, J. **Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates**. NanoLetters, 817-822, 2002.
66. WEBER, B.; MELCHIOR, W.; GEHRKE, R.; DOERR, H. W.; BERGER, A.; RABENAU, H. **Hepatitis B virus markers in Anti-HBc only positive individuals**. Journal of Medical Virology, 312-319, 2001.
67. WONG, S. S.; JOSELEVICH, E.; WOOLLEY, A. T.; CHEUNG C. L.; LIEBER, C. M. **Covalently functionalized nanotubes as nanometresized probes in chemistry and biology**. Nature, 52-55, 1998.
68. WU, L.; YAN, F.; JU, H. **AN Amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of Ca125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber**. Journal of Immunological Methods, 12-19, 2007.
69. YANG, H. -I.; LU, S. -H.; LIAW, Y. -F.; YOU, S. -L.; SUN, C. -A.; WANG, L. -Y.; HSIAO C. K.; CHEN, P. -J.; CHEN, D. -S.; CHEN, C. -J. **Hepatitis B “e” antigen and the risk of hepatocellular carcinoma**. The New England Journal of Medicine, 168-174, 2002.

70. YAO, C. -Y.; FU, W. -L. **Biosensors for hepatitis B virus detection.** World Journal of Gastroenterology, 12485-12492, 2014.
71. ZERAVIK, J.; LACINA, K.; JILEK, M.; VLCEK, J.; SKLÁDAL, P. **Biosensor for determination of carboxylic acids in wines based on the inhibition of sarcosine oxidase.** MicrochimActa, 251–256, 20

**Apêndice: Artigo a ser submetido para publicação**

# A polytyramine-based immunosensor for anti-HBc detection

Erika K. G. Trindade <sup>a</sup>, Erika C. L. Soares <sup>a</sup>, Diego G. A. Cabral <sup>a</sup>, \*Rosa A. F. Dutra <sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

## ABSTRACT

*Infection with Hepatitis B Virus (HBV) is a major cause of morbidity and mortality. It is estimated that 350 million people worldwide have chronic HBV infection, which represents about 5% of world population. Due to the high cost and the need for specialized staff in the diagnosis, the development of a nanoimmunosensor for antibodies against Hepatitis B would be important. It was assembled an immobilization matrix for core antigens of Hepatitis B (HBcAg) using an amine polymer (polytyramine) and carboxylated carbon nanotubes (NTC) in a gold electrode sensing surface. The CNTs promoted an increase on electron transfer, they serve as anchors for biomolecules and increase immobilization surface. Electrochemical techniques were used to confirm the processes. The Tyr/NTC-COOH matrix remained stable in the electrode surface and for HBcAg anchoring. The obtained calibration curve presented a linear response ranging from 1.0 to 5.0 ng mL<sup>-1</sup> of anti-HBc with a correlation coefficient of 0.945 and a lower limit of linear response at 0.1 ng mL<sup>-1</sup>. The matrix showed stability and reliability upon analytical responses. This sensor showed outgoing results regarding sensitivity allowing reliable measurements of anti-HBc.*

**KEY WORDS:** *Immunosensors; Carbon nanotubes; Nanomaterials; Hepatitis B; Anti-HBc; HBcAg*

\*Corresponding author. Tel.: +55 81 21267325.

E-mail addresses: rfiremandutra@yahoo.com.br.

(R.F. Dutra).

## INTRODUÇÃO

Infection with Hepatitis B Virus (HBV) is a major cause of morbidity and mortality, especially in developing countries. Currently, billions of people are contaminated with the virus, hence the great concern of public health services in containing and preventing this disease, especially since its transmission is done primarily through parenteral or sexual routes <sup>1,2</sup>. Thereby, the transfusion services have to conduct a thorough investigation of serological markers that can determine HBV infection in collected blood bags <sup>3</sup>. The infection diagnosis is made mostly through the search of HBV serological markers. However, these tests require specialized manpower and are frequently time consuming <sup>4</sup>.

Currently, the antibodies that are produced against the core antigen of Hepatitis B Virus (anti-HBc) are reported as the most important markers in the screening of patients. All anti-HBc indicates infection. The anti-HBc IgG persists throughout life, indicating past infection. Therefore, it is the most used in diagnostics <sup>5</sup>.

Biosensors are analytical devices that use biological components as recognition elements for detecting target analytes. When immunoglobulins or antigens are used as bioreceptors for biosensors, these are classified as immunosensors <sup>6,7</sup>. In this context, immunosensors can be fast and sensible alternatives for anti-HBc detection to be used in pre-screening of blood donors, intending to reduce costs with blood bags in blood banks <sup>8</sup>.

Choosing the transducer is one of the most important steps in immunosensor development. Electrochemical amperometric technique is one of the most used, due to be easily miniaturized and suffer very little influence from the environment<sup>9-11</sup>. Another important step in the preparation of a biosensor is the biomolecule immobilization on the electrode surface. Different techniques for modifying the electrode surface have been developed aiming the improvement of stability and sensitivity in these sensors<sup>12, 13</sup>. The most common technique for biomolecule incorporation is the use of polymers and/or nanomaterials to provide more stable immobilization through covalent bonds. It occurs by chemical bonds between functional groups of the biomolecule and functional groups of the material, and generally involves the activation of the sensor or the molecule, with the removal of weakly bound molecules, forming more stable surfaces<sup>14</sup>.

Functionalized polymers have been widely used for the development of immunosensors and have replaced conventional materials<sup>15</sup>. Polymers with aromatic rings are interesting due to its easy electropolymerization, a property related to the resonance effect of the benzene ring. Two of the most used in immunosensors are polyaniline and polytyramine. Polyaniline films are very conductive, which sometimes leads to noise in the readings when associated with nanomaterials and easy oxidation; and they also need the presence of redox probes or buffer solutions to perform measurements<sup>16-18</sup>.

Meanwhile, polytyramine films are nonconductive, showing passivating properties towards a redox probe, also forming ultrathin films when electropolymerized. The polytyramine electropolymerization on gold electrodes has been demonstrated to be highly effective, showing very good stability. Electropolymerized polytyramine films form a reduction peak at 0,6 V, allowing for more reliable readings seeing as blood components have a tendency to oxidize, thus, avoiding interference in whole blood or serum samples<sup>19</sup>. The polytyramine amine groups are electroinactive, enabling stable covalent bonds with biomolecules or functionalized nanomaterials, such as Carbon Nanotubes (CNTs)<sup>20, 21</sup>. CNTs have attracted great interest in the biosensor area due to properties such as increased electric transfer kinetics, the possibility of serving as biomolecules anchors and increase charge transfer<sup>22, 23</sup>.

In this work, polytyramine was used along with CNTs to create a very stable immobilization matrix for amperometric detection of anti-HBc by antigen immobilization (HBcAg) in a gold electrode surface. The polymer allowed the visualization of redox peaks in a KCl solution, enabling the detection of the analyte without the need to use buffer solutions or electrochemical probes.

## **EXPERIMENTAL**

### ***Materials***

Carbon nanotubes functionalized with carboxylic groups (-COOH NTC) were purchased from Dropsens, Llanera (Asturias), Spain. HBcAg and anti-HBc were purchased from Abcam Plc, Cambridge, England. Tyramine (Tyr), 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

The other solutions, such as PBS buffer, sulfuric acid, potassium ferricyanide and ferrocyanide, and all others were prepared with ultrapure water (Milli-Q), Millipore Corporation, Darmstadt, Germany.

### ***Apparatus and Measurements***

Electrochemical tests were performed in a three electrode system containing a helical auxiliary platinum electrode, a reference electrode Ag/AgCl (sat. KCl) and a gold working electrode in a closed glass cell, connected to a potentiostat/galvanostat IviumCompactStat (Eindhoven, Netherlands) coupled to a microcomputer and controlled by IviumSoft software. Cyclic voltammetry (CV) was performed to accompany each surface modification step of the working electrode. Square Wave Voltammetry (SWV) was performed to measure the concentrations of antibodies. Voltammetry measurements were performed both in solutions of KCl only (100 mmol L<sup>-1</sup>) but also containing 5 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> as redox probe. The analytical tests were performed in KCl solution only.

### ***Electrode surface modification***

After mechanical polishing of the working electrode in alumina at 0.3 microns to remove impurities present on the electrode surface (pre-treatment), the surface was washed with distilled water, and cleaning confirmed by VC. Then, the electropolymerization was performed using 2.5mM of Tyr in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M by 10 VC cycles. Thereafter, a solution containing NTC-COOH (1mg) in 1mL of dimethylformamide was prepared and homogenized in an ultrasonic bath for 2h. The nanotubes were then activated in an EDC/NHS solution (20 mmol L<sup>-1</sup> and 50 mmol L<sup>-1</sup> respectively) prepared at the time of use and left at room temperature for 30 min. Afterwards, 10 μL of the NTC-COOH/EDC/NHS suspension were dripped on the modified electrode surface and left in room temperature until complete evaporation of the solvent.

### ***HBcAg immobilization and analytical response***

The antigen (HBcAg) was immobilized on the nanostructured electrode surface by incubating 10μL of an antigen solution (100 μg/mL) prepared in ultrapure water (Milli-Q) on the electrode area for hour. Blocking of nonspecific binding sites was accomplished by incubating a PBS-glycine solution (50 mmol L<sup>-1</sup> of glycine) for one hour. The analytical response tests at the immobilization matrix (Fig. 1) were performed using anti-HBc concentrations of 0.1 and 1.0 ng/mL. The anti-HBc was prepared in PBS buffer at pH 7.4 and 10μL of this solution was incubated on the electrode surface in the presence of the antigen with half hour incubation periods. The lower detection limit was obtained with 0.1 ng/mL concentration. It was also used the concentration of 1.0 ng/mL, for obtaining the linear response limit of the antibody and compare to commercially sold rapid tests such as the Hepatitis Test, World of Health Biotech Co., Ltd. - Beijing, China.

**Fig.1.** Graphic scheme showing the expected immobilization matrix.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Optimization of Polytyramine (Pt) Concentration*

The concentration curve (Fig. 2) obtained with different dilutions of tyramine (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 and 5 mmol L<sup>-1</sup>) indicates that after a 2.5 mmol L<sup>-1</sup> concentration is reached a plateau, in which the current difference remains almost constant, showing that there is a saturation in the monomer supply for electropolymerization. Therefore this concentration (2.5 mmol L<sup>-1</sup>) was adopted for subsequent phases of the work.

**Fig. 2.** Tyramine concentration curve with concentration values of 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5 to 5 mmol L<sup>-1</sup>

After tyramine electropolymerization, in comparison with the clean electrode, there was an increase of 88% observed in the electroactive area (Fig. 3) calculated according to the Randles-Sevcik equation:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C$$

Where  $I_p$  is the peak current value,  $A$  is the area of the electroactive electrode (cm<sup>2</sup>),  $D$  is the diffusion coefficient of the redox probe (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>),  $n$  is the number of electrons involved in the redox reaction,  $v$  is the potential scan rate (V s<sup>-1</sup>) and  $C$  is the concentration of the desired molecule in solution.

**Fig. 3.** Cyclic voltammograms showing the cleaned electrode (a) and the electrode after polymerization of tyramine (b).

This large area increase is due to the aromatic ring resonance effect, and enhances the conductivity when the polymerization is carried out in acid. The film response was observed in aqueous KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, ensuring that the reduction and oxidation peaks observed at 1.2 and 0.6 V, respectively, are due to the oxidation and reduction of polytyramine (Pt), since KCl solution is considered inert electrochemically.

### *Electrode surface modification*

The study of CNTs activation period demonstrated that the current increases with time according to a sigmoidal model. One hour activation period was considered ideal, due to the proportional increase of the electroactive area. This phenomenon is most likely due to both

the carbodiimide groups present in EDC and NHS, which can promote the activation of the CNTs carboxylic sites due to the formation of an intermediate O-acilisourea which is easily displaced by primary amino groups during reaction. Thus, the primary amine forms an amide bond with the carboxylic group and the EDC by-product is released as a soluble urea derivative. The NHS is normally used together with EDC to create more stable intermediates, since the O-acilisourea is very reactive. The NHS ester forms are more stable, allowing the coupling of the amine with the carboxylic group in physiological pH<sup>24</sup>.

Deposition of nanotubes on the Pt film resulted in an increase of 87% of the electroactive area (Fig. 4) in KCl solution, calculated by the Randles-Sevcik equation previously mentioned. Observing the current reduction, a large peak appears at around 0.5 V. As the blood components are more prone to oxidation, reduction peak was chosen for viewing by the following steps VOQ. Observing the VOQ graph of the electrode before and after CNTs addition, it increases peak reduction approximately 85% in comparison with the Pt film only electrode surface.

**Fig. 4.** Square Wave Voltammetry graph showing the area increase after the CNT addition.

#### ***HBcAg immobilization and glycine blockage***

HBcAg addition and its presence were verified using SWV. The immobilization of the antigen caused a shift in the cathodic peak potential with in comparison with the peak of Tyr/NTCs matrix alone, from 0.55 to 0.57 V. Some antigens, such as HBcAg, have a certain charge density in structure, which can cause this phenomenon<sup>25</sup>.

Addition of glycine was observed through SWV showed an average reduction of 22.5% (Fig. 5) with in comparison with the antigen-only peak, which can demonstrate the blocking of the free carboxylic sites. The presence of free amino sites on the glycine molecule provides this connection, it is important to avoid nonspecific amide bonds with the antibody or substances present in the sample<sup>26</sup>.

**Fig. 5.** Square Wave Voltammetry graph showing the effect of glycine addition.

#### ***Stability and Mechanistic Studies***

According to the TYR/NTC matrix stability graphic were calculated the standard deviations and variation coefficients for the oxidation and reduction peaks for 15 cycles of VC applied to the matrix in redox probe ( $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). The oxidation current standard deviation was 1.058 and the variation coefficient was 1%, the reduction current standard deviation was 1.288 and the variation coefficient was 1%, demonstrating a significant stability of the matrix.

The scanning speed test performed with VC cycles at speeds ranging from 10 to 120  $\text{mV s}^{-1}$  (Fig. 6 (a)) showed a proportional symmetry of the oxidation and reduction peaks and this

indicates the reversibility of the process. Both peaks increased linear (with linear correlation coefficient  $r = 0.998$ ) and proportionally to the square root of the scan rate (Fig. 6 (b)), showing that the process is diffusion controlled<sup>27</sup>.

**Fig. 6. a)** Cyclic voltammograms scan rates 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 and 120  $\text{mV s}^{-1}$  (inside-out); **b)** Current peaks variation in relation to the scan rate square root.

### *Analytical response*

Observing SWV graphics before and after anti-HBc incubation for 30 minutes (in KCl solution at 100  $\text{mmol L}^{-1}$ ), an average reduction of approximately 22% was observed after incubation of anti-HBc 0,1  $\text{ng/mL}$  (Fig. 7) in presence of HBcAg, this being the lower limit of linear response obtained for the matrix. This can demonstrate a higher sensitivity of the array in comparison with commercially sold rapid tests (Test Hepatitis World of Health Biotech Co., Ltd. - Beijing, China), which showed minimum detection limit of 2.0  $\text{ng/mL}$ .

**Fig. 7.** SWV graph showing the effect of anti-HBc [0.1 $\text{ng/ml}$ ] immobilization on the matrix in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$  HBcAg.

The analytical response curve of successive anti-HBc solution incubations (1.0  $\text{ng/mL}$ ) (Fig. 8 (a)), for 30 minutes, showed the formation of a plateau after the 5th incubation showing immunosensor saturation. The linear response of the immunosensor (Fig. 9 (b)) range from 1.0 to 5.0  $\text{ng/mL}$  with  $r = 0.945$ , showing similarity to the commercial rapid tests previously mentioned.

The KCl solution used for reading analytical responses is considered electrochemically inactive and it is very similar to the electrochemical state of the blood. This can allow the reading of blood or serum samples without the need to use buffer solutions or electrochemical probes, which is very important in the miniaturization process.

**Fig. 8. a)** Detection limit curve ranging from 1-10  $\text{ng/ml}$  of anti-HBc with values obtained in 0.5 V potential; **b)** Linear detection range ranging from 1-5 $\text{ng / ml}$ .

The repeatability test showed a 1% variation coefficient in a single electrode on the same conditions after twenty consecutive measurements. The reproducibility study was realized in eight electrodes with a 6% variation coefficient, this error percentage being considered within the ideal range, between 1 and 10%, demonstrating the reliability of the matrix<sup>28</sup>.

## CONCLUSION

The matrix developed in this work using polytyramine and CNTs on a gold electrode showed good stability for HBcAg immobilization. The analytical response for anti-HBc was read in the presence of KCl solution only, which avoids the use of buffers or electrochemical probes, and this is an important advancement towards immunosensor miniaturization. The matrix also showed lower detection limit than that found on the market, making it more sensitive than existing rapid diagnostic tests. Other tests have shown the reliability of the matrix, and its good reproducibility and stability, with process reversibility.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support during this work.

## REFERENCES

1. M. F. Ferreira, *Journal*, 2000, 33, 389-400.
2. T. Xu, J. Miao, Z. Wang, L. Yu and C. Li, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2011, 151, 370-376.
3. N. A. SALLES, E. C. SABINO, C. C. BARRETO, A. M. E. BARRETO, M. M. OTANI and D. F. CHAMONE, *Journal*, 2003., 13.
4. F. S. PELIÇÃO, Mestrado, UFES, 2007.
5. S. Y. Kwon and C. H. Lee, *Journal*, 2011, 17, 87-95.
6. J. Wang, *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, 21, 1887-1892.
7. C. d. S. Riccardi, P. I. d. Costa and H. Yamanaka, *Química Nova*, 2002, 25, 316-320.
8. B. Weber, W. Melchior, R. Gehrke, H. Doerr, A. Berger and H. Rabenau, *Journal of Medical Virology*, 2001, 64, 312-319.
9. K. Pavey, A. Hunter and F. Paul, *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 18, 1349-1354.
10. D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, X. Zhong, Y. Liu, J. Dai and L. Zhang, *Analytical Biochemistry*, 2004, 333, 345-350.
11. L. Wu, F. Yan and H. Ju, *Journal of Immunological Methods*, 2007, 322, 12-19.
12. S. Wang, N. Mamedova, N. Kotov, W. Chen and J. Studer, *Nano Letters*, 2002, 2, 817-822.
13. R. S. Freire, C. A. Pessoa and L. T. Kubota, *Química Nova*, 2003, 26, 381-389.
14. E. Lojou and P. Bianco, *Journal of Electroceramics*, 2006, 16, 79-91.
15. M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert and D. Barnett, *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13, 953-962.

16. C. Dhand, M. Das, M. Datta and B. Malhotra, *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26, 2811-2821.
17. C. Betty, *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 25, 338-343.
18. C. Chuang, Y. Yu, D. Lee, T. Wu, C. Chen, S. Chen, H. Wu and Y. Huang, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2014, 16, 869-877.
19. D. Losic, M. Cole, H. Thissen and N. Voelcker, *Surface Science*, 2005, 584, 245-257.
20. A. Ehsani, S. Adeli, F. Babaei, H. Mostaanzadeh and M. Nasrollahzadeh, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2014, 713, 91-97.
21. O. Abrahao, Jr., A. E. da Hora Machado, F. F. Siqueira Silva, J. M. Madurro, C. M. de Castro and M. T. Sonoda, *Journal of Molecular Structure*, 2013, 1037, 200-208.
22. S. L. R. Gomes-Filho, A. C. M. S. Dias, M. M. S. Silva, B. V. M. Silva and R. F. Dutra, *Microchemical Journal*, 2013, 109, 10-15.
23. M. H. Herbst, M. L. F. Macedo and A. M. Rocco, *Quimica Nova*, 2004, 27, 986-992.
24. C. A. Erdmann, UEPG, 2013.
25. M. Silva, A. Dias, B. Silva, S. Gomes, L. Kubota, M. Goulart and R. Dutra, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90, 194-200.
26. J. Zeravik, K. Lacina, M. Jilek, J. Vlcek and P. Skladal, *Microchimica Acta*, 2010, 170, 251-256.
27. G. Grawe, T. de Oliveira, E. Narciso, S. Moccelini, A. Terezo, M. Soares and M. Castilho, *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 63, 407-413.
28. H. Q. Peng, L. B. Alemany, J. L. Margrave and V. N. Khabashesku, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 15174-15182.

### CAPTIONS FOR FIGURES

**Figure 1.** Graphic scheme showing the expected sensing layer

**Figure 2.** Tyramine concentration curve with concentration values of 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5 to 5 mmol L<sup>-1</sup>

**Figure 3.** Cyclic voltammograms showing the cleaned electrode (a) and the electrode after polymerization of tyramine (b)

**Figure 4.** Square Wave Voltammetry graph showing the area increase after the CNT addition

**Figure 5.** Square Wave Voltammetry graph showing the effect of glycine addition.

**Figure 6. a)** Cyclic voltammograms scan rates 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 and 120 mV s<sup>-1</sup> (inside-out); **b)** Current peaks variation in relation to the scan rate square root.

**Figure 7.** SWV graph showing the effect of anti-HBc [0.1ng/ml] immobilization on the matrix in the presence of 100µg/mL HBcAg.

**Figure 8. a)** Detection limit curve ranging from 1-10 ng/ml of anti-HBc with values obtained in 0.5 V potential; **b)** Linear detection range ranging from 1-5ng / ml.

## FIGURES

Fig. 1.

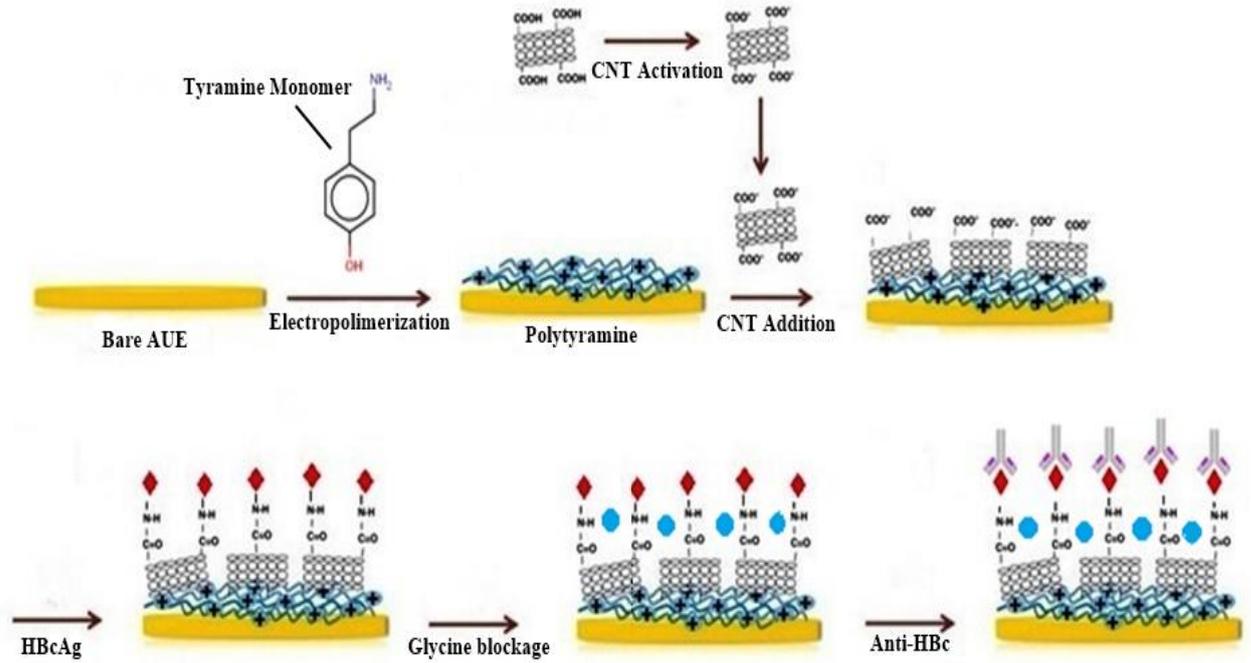


Fig. 2.

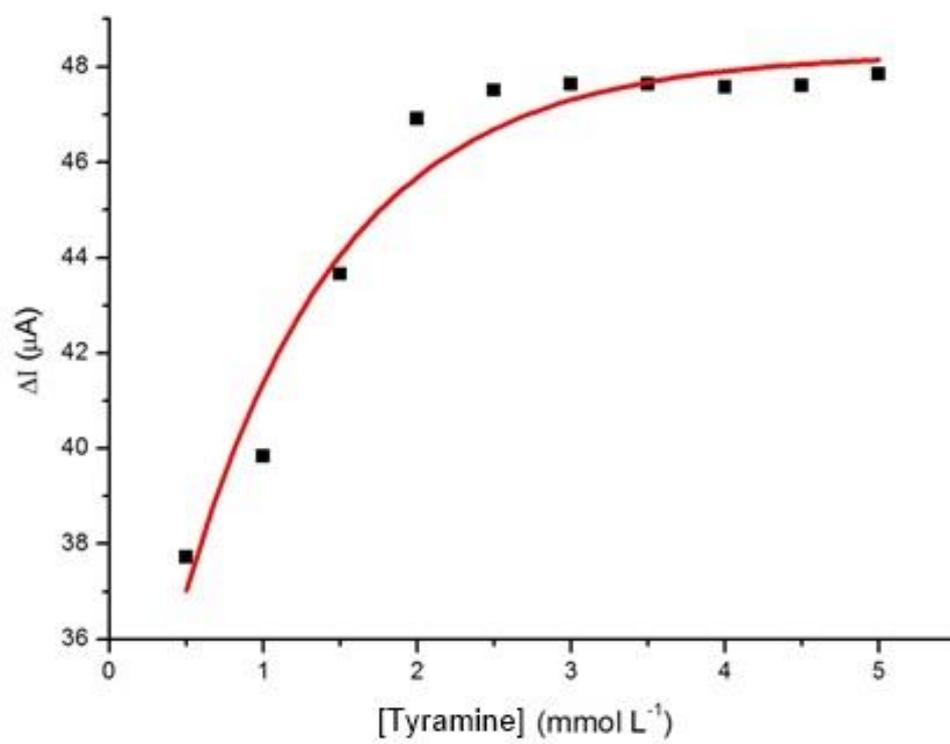


Fig. 3.

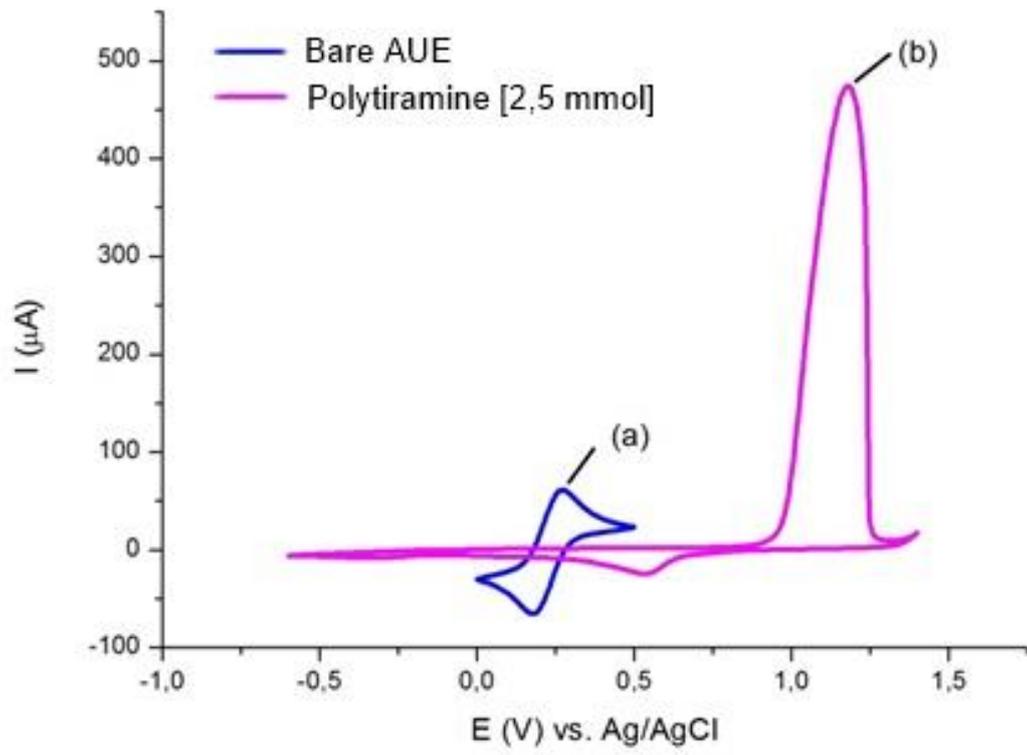


Fig. 4.

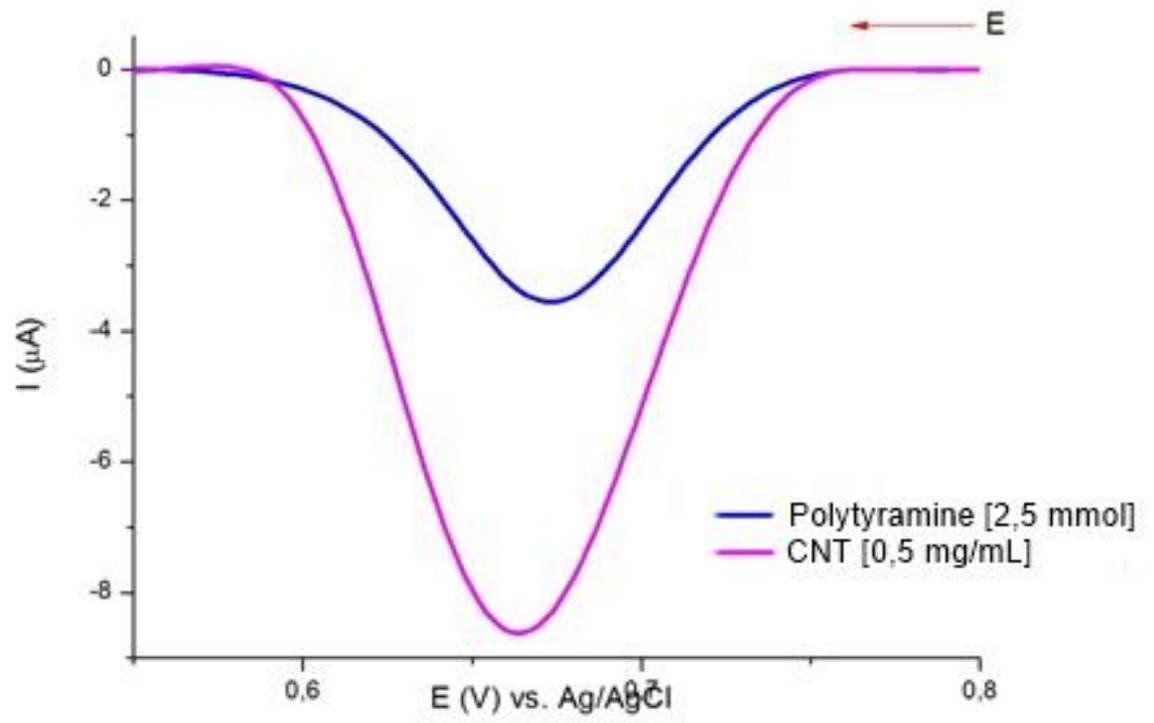
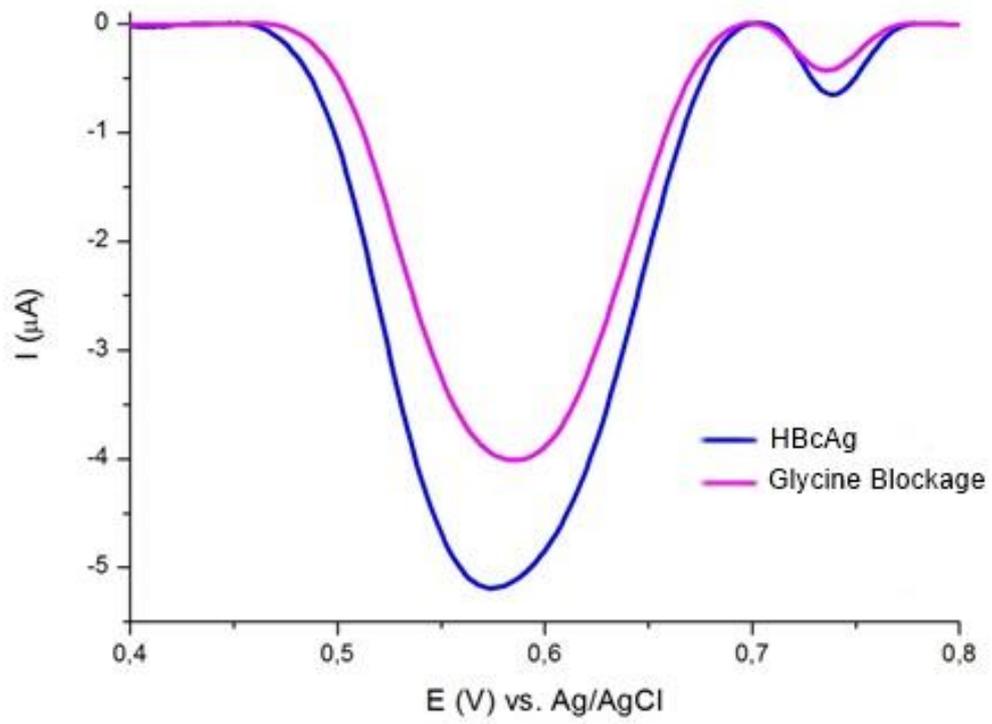


Fig. 5.



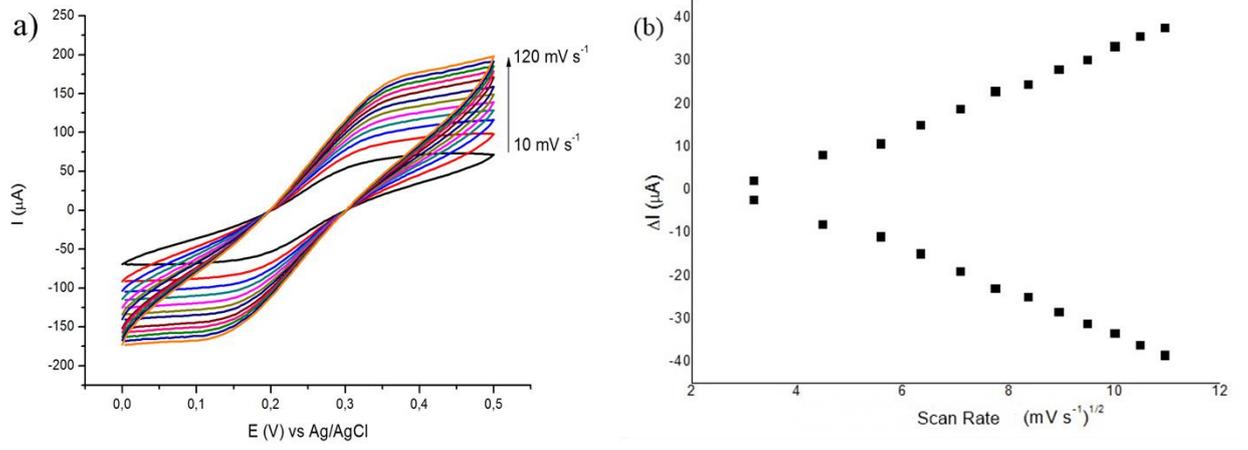
**Fig 6.**

Fig. 7.

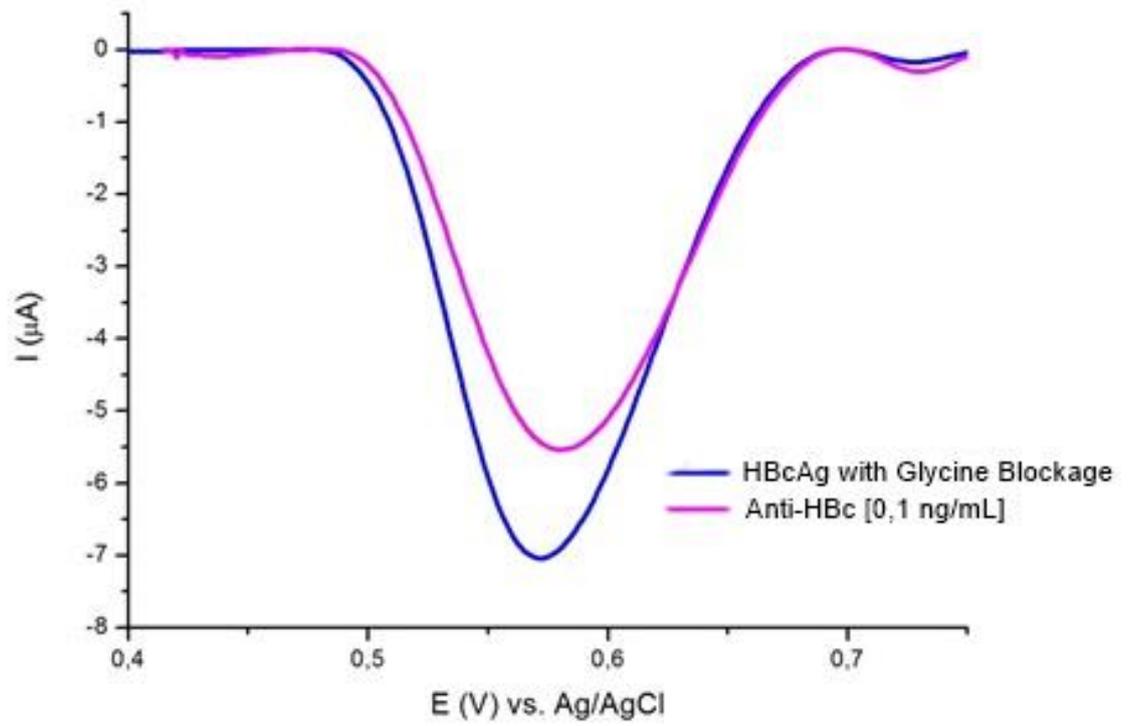


Fig. 8

