



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA
HEPATITE B BASEADOS EM IMUNOSSENSORES**

ERIKA CRISTINA DE LIMA SOARES

RECIFE, PE

2016

ERIKA CRISTINA DE LIMA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA
HEPATITE B BASEADOS EM IMUNOSSENSORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biotecnologia, RENORBIO, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

RECIFE, PE

2016

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Soares, Erika Cristina de Lima

Desenvolvimento de testes diagnósticos para Hepatite B baseados em imunossensores / Erika Cristina de Lima Soares– Recife: O Autor, 2016.

104 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências

- 1. Hepatite B 2. Nanotecnologia 3. Diagnóstico I. Dutra, Rosa Amália Fireman (orientadora) II. Título**

616.3623

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-295

ERIKA CRISTINA DE LIMA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA HEPATITE B
BASEADOS EM IMUNOSSENSORES**

DATA DA APROVAÇÃO: 02/03/2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra
(Depto. de Eng. Biomédica / UFPE) – Orientadora

Profa. Dra. Ana Carolina Matos Dias
(Empresa Joy Street) – 1° Examinador

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
(Depto. de Bioquímica / UFPE) – 2° Examinador

Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
(Lab. Aggeu Magalhães- Fiocruz / UFPE) – 3° Examinador

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
(Depto. de Bioquímica/ UFPE) - 5° Examinador

Recife, 2016

***“ Descobertas não acontecem por causa da
medicina. Elas acontecem porque alguém tem medo
de parar de tentar.”***

(Grey's Anatomy)

*Ao Deus de Supremo Amor e a Espiritualidade Amiga,
Presenças essenciais em toda minha caminhada, por todo amparo, inspiração, proteção e
metamorfozes necessárias para que hoje a alegria e consciência do dever cumprido,
fossem comemoradas...*

Com Amor e Gratidão!!!!

Finalizando mais uma etapa, a memória chega a falhar de quantas vezes e a quantas pessoas, situações e a vida, eu disse: **Obrigada!** Isso sem contar que os motivos foram os mais variados...Mas vamos lá!

A **Deus e a Espiritualidade** pela abençoada oportunidade de ampliar os horizontes da inteligência, nunca esquecendo que humildade, perseverança e discernimento são pedras angulares;

Aos meus pais **Geralda e Eduardo**, pela chance do retorno ao palco da Terra, amor, esforço, disciplina e incentivo desde o ventre até sempre... afinal somos eternos e a lição uma vez aprendida, jamais será esquecida!

Ao meu amado **Otávio Scerni**, que com seu sorriso lindo e jeito carinhoso, trouxe novos coloridos, incentivos e alegrias na reta final desta caminhada; que o nosso amor para sempre viva, minha dádiva!!!

A orientadora, mestra, mas acima de tudo amiga **Rosa Dutra**, pela confiança, atenção, lições, conversas; tudo será levado com muito carinho pelas estradas da existência...

As amigas de todas as horas: **Marília, Jessika, Leila e Inalda**, pelas conversas, conselhos, enxugar de lágrimas, risadas, cafés, açais.. Vocês são o bem mais precioso que a vida me trouxe!

Ao amigo e colega de bancada **Rogério Tavares** (Deptº de Química Fundamental- DQF-UFPE), pela ajuda e dedicação incondicionais nos meus “ primeiros passos” no mundo da eletroquímica. Meu carinho e gratidão!

Aos amigos e companheiros de trabalho diário no LAPED: **Djair, Diegos (Cabral e Ricardo), Cybelle, Erika Trindade, Gilvânia e mais meio mundo que ainda está no cotidiano e os que já concluíram sua jornada e hoje galgam seu espaço**, pelos momentos de cooperação, conversas alegres, brincadeiras, cafés... Vocês se tornaram a extensão da minha família!

A FACEPE pelo auxílio financeiro.

Sumário

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	VI
1- INTRODUÇÃO:	17
2.1 – GERAL :.....	21
3.1- BIOSSENSORES:.....	32
3.2 – IMUNOSSENSORES:	36
4- ELETRODOS IMPRESSOS:.....	39
5- MEDIDAS ELETROQUÍMICAS:.....	43
5.1.1 – Cíclica:.....	44
5.1.2 – Onda Quadrada:.....	46
5.1.3 – Pulso Diferencial:.....	48
6- NANOTECNOLOGIA NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES:.....	49
6.1 – NANOMATERIAIS: NANOTUBOS DE CARBONO:.....	49
7- FILMES POLIMÉRICOS:.....	54
7.1 – NÁFION:.....	56
8- DOENÇAS DE ALTA MORBIMORTALIDADE:	60
8.1 – HEPATITE B:.....	60
9- ARTIGO 1:	61
<i>Detection of hepatitis B Vírus code antibodies using a disposable nanohybrid gold electrode</i>	

10- ARTIGO 2:..... 84
A label free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on Hyaluronic acid-
Carbon nanotube hybrid film.

11- REFERÊNCIAS:85

RESUMO

A infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) é considerada uma enfermidade de alta morbimortalidade, apresentando diagnóstico complexo e quadro de persistência, fatores que dificultam a detecção, terapêutica e cura. Relatos variados têm apontado os imunossensores como importantes ferramentas de auxílio no diagnóstico de doenças, definido como um dispositivo que converte respostas de eventos biológicos a partir da interação antígeno-anticorpo em sinal elétrico. No presente estudo foram desenvolvidos biossensores para detecção de anticorpos contra o nucleocapsídeo do HBV (Anti-HBc) mais perene apresentado no diagnóstico da doença. Recentemente, o emprego de nanomateriais no desenvolvimento de tais dispositivos tem despertado interesse devido às propriedades destes materiais. Particularmente, os nanotubos de carbono (NTCs) têm oferecido aos imunossensores melhoria na condutividade, aumento na velocidade de transferência de carga, aumento da área eletródica com maior possibilidade de imobilização de biomoléculas. Nesta tese, foram empregados o ácido hialurônico e o náfon como suporte para forte interação com os NTC funcionalizados em eletrodos de carbono vítreo e de ouro fabricado sobre folha de acetato. Os dispositivos foram caracterizados por técnicas de imagem (microscopia de força atômica) e eletroquímicas (voltametrias de onda quadrada e cíclica), as quais demonstraram a estabilidade da plataforma, imobilização eficaz e sensibilidade. O primeiro protótipo em eletrodos de carbono vítreo modificado com filme de ácido hialurônico associado a nanotubos funcionalizados apresentou resposta linear de 1 a 6ng/ml com limite de detecção de 0,03ng/ml. No segundo protótipo com eletrodos impressos de ouro modificado com filme etanólico de náfon associado a nanotubos funcionalizados, o imunossensor apresentou resposta linear de 0,5 até 2ng/ml, com limite de detecção de 0,15 ng/ml de anti-HBc. Os protótipos desenvolvidos apresentam-se como potenciais para diagnóstico da HBV.

Palavras-chave: Imunossensor, Nanotecnologia, Hepatite B, Dispositivos point-of-care, Diagnóstico.

ABSTRACT

Infection with hepatitis B virus (HBV) is considered a high mortality disease, with complex diagnosis and persistence framework, factors that hinder detection, therapy and cure. Various reports have pointed out the immunosensors as important aid tools in the diagnosis of disease, defined as a device that converts biological events of answers from the electrical signal in antigen-antibody interaction. In the present study biosensors have been developed for the detection of antibodies to the HBV nucleocapsid (anti-HBc) Perennial presented in the diagnosis of disease. Recently, the use of nanomaterials in the development of such devices has aroused interest because of the properties of these materials. Particularly, carbon nanotubes (CNTs) have offered immunosensors improvement in conductivity, increased charge transfer speed, increased electrodic area with the highest possibility of immobilization of biomolecules. In this thesis, we employed hyaluronic acid and nafion as support for strong interaction with the NTC functionalized glassy carbon electrodes and manufactured gold on acetate sheet. The devices were characterized by imaging techniques (atomic force microscopy) and electrochemical (cyclic and square wave voltammetry), which demonstrated the platform stability, effective restraint and sensitivity. The first prototype on glassy carbon electrode modified with hyaluronic acid film associated with functionalized nanotubes showed a linear response of 1 to 6ng/ ml with detection limit 0,03ng / ml. In the second prototype printed gold electrodes modified with ethanolic nafion film associated with functionalized nanotubes, the immunosensor showed a linear response of 0.5 to 2 ng / ml, the detection limit of 0.15 ng / ml of anti-HBc. The developed prototype is present as diagnostic potential for HBV

Keywords: Immunosensor, Nanotechnology, Hepatitis B, point-of-care devices, diagnostics.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1- Mapa de prevalência da Hepatite B pelo mundo. O Brasil apresenta endemicidade intermediária com exceção da Amazônia Ocidental, onde a prevalência é de aproximadamente 20%.

Figura 2- Decurso da infecção pelo HBV (Aguda e Crônica) e seus respectivos marcadores sorológicos.

Figura 3- Vírus da Hepatite B, com suas estruturas e alguns dos marcadores sorológicos

Figura 4- Organograma mostrando as vias e possibilidades de evolução do processo infeccioso por hepatite B. Em casos de portadores assintomáticos, a ocorrência de hepatite fulminante é fato raro.

Figura 5- Possíveis resultados sorológicos da hepatite B, de acordo com o estágio da enfermidade.

Figura 6- Esquema representativo da construção dos biossensores. I) Tipos de analitos; II) elementos biorreceptores; III) Transdutor; IV) sistema eletrônico.

Figura 7- Imunoensaios livres de marcação e marcados.

Figura 8- Etapas de construção de microdispositivos pelo processo fotolitográfico. Em I: disposição do filme metálico sobre o substrato; II: posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; III: revelação da imagem fotogravada no fotorresiste; IV: corrosão de regiões da camada metálica não protegida pelo fotorresiste; V: corrosão do substrato transferindo a configuração para os microcanais; VI: remoção de camadas: fotorresiste, metal e selagem do microdispositivo.

Figura 9- Ilustração representativa de uma célula eletroquímica num sistema de três eletrodos.

Figura 10- Princípio da Voltametria Cíclica (VC). Em A: potencial variando com tempo; em B: perfil de um voltamograma cíclico num sistema redox reversível.

Figura 11 - Representação da Voltametria de Onda Quadrada. **Em A:** 1) potencial na forma de onda; 2) Escada de potencial; 3) Forma de aplicação do potencial na SWV; 4) Forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) Corrente diferencial; 7) Corrente total; **em B:** aplicação do potencial na Voltametria de Onda Quadrada.

Figura 12- Voltametria de pulso diferencial (VPD). Mensuração de sinal de corrente livre de ruído.

Figura 13- Alguns exemplos de nanomateriais. Cada um apresenta propriedades, potenciais e aplicabilidades variados, dentre estas a modificação de superfícies de biossensores, proporcionando aumento da área eletroativa.

Figura 14- Tipos de estruturação dos nanotubos de carbono. Em A) nanotubos de parede simples; em B) Múltiplas paredes.

Figura 15– Representação esquemática da configuração de bandas de energia. Em **(1)**, banda de valência parcialmente preenchida (característica dos metais que apresentam um elétron no subnível s- cobre); **(2)** BV totalmente preenchida com sobreposição da banda de condução (BC) (comum quando há superposição de subníveis durante a ligação química, como no magnésio metálico); **(3)** BV totalmente preenchida e uma banda larga de energia proibida separando-a da BC (própria dos materiais isolantes); **(4)** BV totalmente preenchida e uma banda estreita de energia proibida separando da BC (aqui se encontram o semicondutores).

Figura 16- Unidade monomérica de náfiôn.

Figura 17- Estrutura química do ácido hialurônico.

ARTIGO 1

Figure 1- Electrode construction by the photolithographic process

Figure 2 - Cyclic voltammograms showing the conductivity of the Nafion+
1mg of MWNTC-COOH;

Figure 3- Gold printed electrode topographies.

Figure 4- Scanning Electron Microscopy (SEM) of the gold printed
electrode surface.

Figure 5 - The stability and durability of the Nafion matrix.

Figure 6- Characterization process in the printed gold electrode.

Figure 7- Square wave voltammograms, calibration curve, linear fit of the
Immunosensor.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac Anticorpo

Anti-HBc – Anticorpo contra o antígeno do core da Hepatite B

AFM "*Atomic force microscopy*" - Microscopia de força atômica

Ag Antígeno

CNT "*Carbon nanotube*" - nanotubo de carbono

DPV- "*Differential Pulse Voltammetric*"- Voltametria de Pulso Diferencial

ELISA "*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*" – Ensaio Imunoenzimático

HBc-Ag- Antígeno do core da Hepatite B

HBV- Vírus da Hepatite B

I - Corrente

I_{pa}- Corrente de pico anódico

I_{pc}- Corrente de pico catódico

MEV- Microscopia de Força Atômica

MWCNT "*Multi walled carbon nanotube*" - Nanotubo de carbono de múltiplas Paredes

Ng/mL – Nanogramas por mililitro

NTC Nanotubo de carbono

PBS - "*Phosphate buffer solution*" - solução tampão fosfato

pH- Potencial hidrogeniônico

SWV- “*Square Wave Voltammetric*”- Voltametria de Onda Quadrada.

1-INTRODUÇÃO:

A aplicação do termo “biotecnologia” foi empregada pela primeira vez em 1919 pelo húngaro Karl Ereky, quando se referiu às atividades cujos produtos se originavam da ação de organismos vivos em matérias brutas; desta maneira, a “biotecnologia” refere-se à utilização de seres vivos e seus componentes na agricultura, alimentação e saúde, além de outros usos como a produção ou modificação de produtos em procedimentos industriais (AMÂNCIO & CALDAS, 2010). Num panorama mais abrangente, a Convenção sobre Diversidade da Organização das Nações Unidas –ONU- mostrou um conceito mais técnico acerca do tema: “Biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos e processos para utilização específica.” (LEITE & MUNHOZ, 2013).

A biotecnologia apresenta área de atuação abrangente e no contexto da saúde, tem ganhado destaque na produção de biofármacos (anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes), reagentes para kits diagnósticos, terapias gênicas, produção de vacinas, entre outras. No desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, tornou-se ferramenta de grande utilidade, pois além de mostrar a eficiência da multidisciplinaridade, agregando a biologia, a química, a nanotecnologia, a engenharia e outras, trabalhando com um enfoque comum, apresenta vantagens

como a portabilidade de algumas técnicas, rapidez e eficiência do diagnóstico, o que viabiliza o desenvolvimento e a aplicabilidade de uma medicina mais ampla no que concerne à profilaxia e terapêutica. Outro ponto a ser destacado, inclui a redução de procedimentos invasivos, custosos e complexos, trazendo maior conforto ao usuário. Determinados tipos de câncer, por exemplo, podem ser detectados numa amostra sanguínea (NETO et.al., 2009).

Dentro desse contexto, os biossensores, definidos como dispositivos analíticos que convertem resposta da interação de um analito e uma espécie biológica imobilizada em um transdutor em um sinal elétrico quantificável, nos últimos vinte anos, têm se destacado, não apenas por servirem como ferramenta complementar de auxílio no diagnóstico, controle e terapêutica de algumas enfermidades, como também pelos avanços alcançados na construção e elaboração do mesmo em si. De acordo com o analito a ser detectado, o biossensor é projetado, no intuito de ser o mais sensível e seletivo possível. Para alcançar limites de detecção mais baixos e a sensibilidade requerida nos testes diagnósticos, a superfície do sensor necessita de modificações com substâncias como náfon, polímero inicialmente utilizado para revestimento de células combustíveis, biopolímeros como ácido hialurônico, componente natural do corpo humano, utilizado para preenchimento do globo ocular, também sendo utilizado na cosmética, entre outras aplicações, em associação com nanomateriais como nanopartículas de prata, ferro, ouro, ou outro metal, quantum dots, grafeno ou nanotubos de carbono, este último com vasta literatura a respeito. Assim, com maior área superficial e quantidade adequada de biomoléculas imobilizadas, é possível promover respostas analíticas com maior sensibilidade e reprodutibilidade (OLIVEIRA et.al.,2011).

Relembrando conceitos da imunologia, a presença de um elemento estranho tais como, epítomos, toxinas, enzimas, proteínas, microrganismos entre outros, promovem reações no sistema imune de quem os alberga, visando o controle da disseminação e a possível eliminação dos mesmos, produzindo células específicas de defesa – anticorpos-. Por ser a ligação-antígeno/anticorpo- bastante específica e de grande afinidade, os métodos de elaboração de imunossensores tem sido objeto de pesquisa na detecção de algumas enfermidades como hepatites virais, dengue, leishmaniose, entre outras.

A estruturação dos processos infecciosos visa integrar e detalhar dados acerca da estrutura epidemiológica, história natural e espectro clínico das enfermidades promovidas pela invasão, alojamento e multiplicação de agentes como vírus, bactérias, fungos, adquiridos no ambiente, dentro do organismo de um hospedeiro, causando desequilíbrios e agravos a saúde; dentro desse contexto, são incluídos processos infecciosos agudos de alta letalidade como raiva, tuberculose e processos crônicos como hepatites virais, helmintoses nos quais existem sobrevida com relativos prejuízos ao portador (FORATINI, 1976; KOLLING et al.2013).

A hepatite B é um grave problema de saúde pública mundial; classificada como uma das maiores viremias crônicas da espécie humana. A infecção pelo vírus pertencente à família hepadnaviridae, é em 70% casos anictérica e subclínica. Na história natural da doença, os casos letais se devem pela evolução clínica para insuficiência hepática fulminante ou, em estágios crônicos, para cirrose hepática e hepatocarcinoma. Durante as últimas décadas, estudos clínicos e

experimentais desenvolvidos em todo mundo ampliaram os conhecimentos sobre a hepatite B em seus diferentes aspectos, gerando avanços significativos nos quesitos diagnóstico e terapêuticos de tratamento. Para diagnóstico da enfermidade, técnicas sorológicas ou de biologia molecular podem ser realizadas; estas também se mostram de fundamental importância no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na monitorização da terapêutica específica. Ensaios sorológicos como o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e os de imunocromatografia são menos dispendiosos, enquanto que os testes moleculares como a PCR (Polymerase Chain Reaction) são mais onerosos; porém estes necessitam de estruturas laboratoriais, além de profissionais especializados (CABRAL, 2014).

Economia de custos, acurácia, análises em tempo real, obtenção do diagnóstico precoce e com rapidez, melhores prognósticos além de medidas terapêuticas aplicadas em pouco tempo, constituem algumas das principais vantagens na elaboração de novos métodos diagnósticos como os biossensores. O aprofundamento de pesquisas sobre formas de elaboração destes dispositivos, as quais, dependem de uma variedade de fatores dentre eles: escolha do material constituinte do eletrodo, modificação de sua superfície, utilizando ferramentas como a nanotecnologia, escolha do analito a ser detectado que possua maiores sensibilidade e especificidade de análise na obtenção de resultados precisos, capacidade de miniaturização com conseqüente portabilidade do dispositivo e utilização do método por profissionais qualificados, mas sem necessidade de maiores especializações, se constituíram nos alicerces que fundamentaram os estudos aqui apresentados.

2- OBJETIVOS:

2.1- GERAL:

Desenvolvimento de biossensores (Eletroquímico e Impresso) visando o imunodiagnóstico da hepatite B.

2.2- ESPECIFICOS:

- Elaborar filmes utilizando polímeros condutores como o náfon e biopolímeros como o ácido hialurônico, em associação com nanomateriais como nanotubos de carbono;
- Modificar a superfície dos eletrodos sólidos de carbono vítreo e tip sensores de ouro com a deposição dos filmes poliméricos produzidos, viabilizando a superfície para os processos de imobilização;
- Caracterizar a modificação da superfície eletródica, com a utilização de técnicas eletroquímicas, (Voltametrias Cíclica, de Onda Quadrada) e de imagem (Microscopia de Força Atômica –AFM, Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV);
- Padronizar a imobilização dos analitos de interesse na superfície do eletrodo de ouro modificado: antígenos recombinantes da Hepatite B (Antígeno do core – HbcAg);

- Otimizar as condições experimentais para os imunossensores, como tempo de incubação, temperatura, etc;
- Transferir todo o procedimento para os eletrodos impressos (Miniaturização).

3- REVISÃO DA LITERATURA:

3.1- DOENÇAS DE ALTA MORBIMORTALIDADE

Numa curta retrospectiva conceitual, torna-se importante recordar o conceito de saúde, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS): *“Um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não somente ausência de afecções e enfermidades.”* No entanto, as medidas tomadas no âmbito da saúde, assim como a formação dos profissionais da área, se mostram voltadas para o controle da morbidade (ocorrência de sintomas, doenças, traumas e deficiências) e da mortalidade (padrão e tendências da ocorrência de óbitos na população). Recentemente é que vem surgindo a preocupação não só com a frequência e a severidade das doenças, mas também com a avaliação de medidas de impacto da doença e comprometimento das atividades diárias, medidas de percepção da saúde e medida de disfunção/ status funcional (FLECK, 2000; VIACAVA et.al., 2012). Paulatinamente, a saúde vai sendo vista dentro de um aspecto amplo, como um conjunto de fatores que precisam estar em equilíbrio para que o indivíduo esteja saudável e possa exercer suas atividades de maneira eficaz e satisfatória.

Assim, o conceito de saúde reflete a conjuntura social, econômica, política e cultural. Ou seja: saúde não representa a mesma coisa para todas as pessoas. Dependerá da época, do lugar, da classe

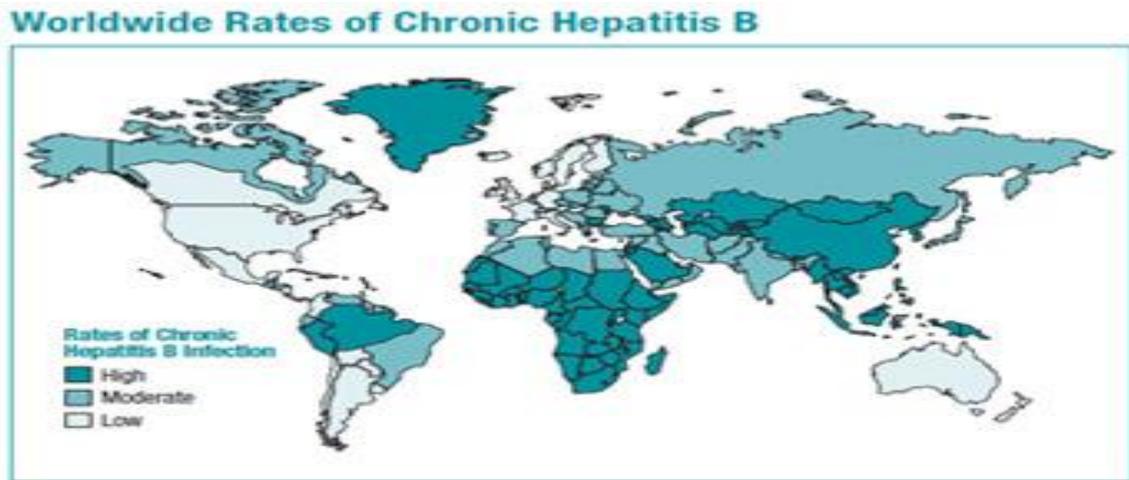
social. Dependerá de valores individuais, dependerá de concepções científicas, religiosas, filosóficas (SCLAR, 2007). Mesmo diante dessa transição dos conceitos acerca da saúde, a organização, elaboração de medidas profiláticas ou de combate às enfermidades e atuação dos serviços terapêuticos ainda se encontra sob a égide inicial, baseada na classificação das doenças pelos índices de morbidade e mortalidade.

3.1.1 -HEPATITE B

A hepatite B é um problema de saúde mundial, principalmente em países na trilha do desenvolvimento. Estima-se que um terço da população global esteja infectada com o vírus e que existam aproximadamente 350 milhões de portadores crônicos distribuídos em várias regiões do mundo, com apenas 2% soroconvertendo espontaneamente por ano. Programas de vacinação em curso parecem ser promissores na tentativa de diminuir a prevalência desta infecção (LOPES &SCHINONI, 2011). O Brasil, de acordo com pesquisas, é considerado um país de endemicidade intermediária, com exceção da Amazônia ocidental, onde a endemicidade é alta, além da circulação da hepatite delta (PEREIRA et.al.,2009). As figuras 1 e 2 retratam respectivamente o mapa da distribuição da hepatite B e o decurso da enfermidade em seus dois estágios: agudo e crônico, com seus respectivos marcadores sorológicos.

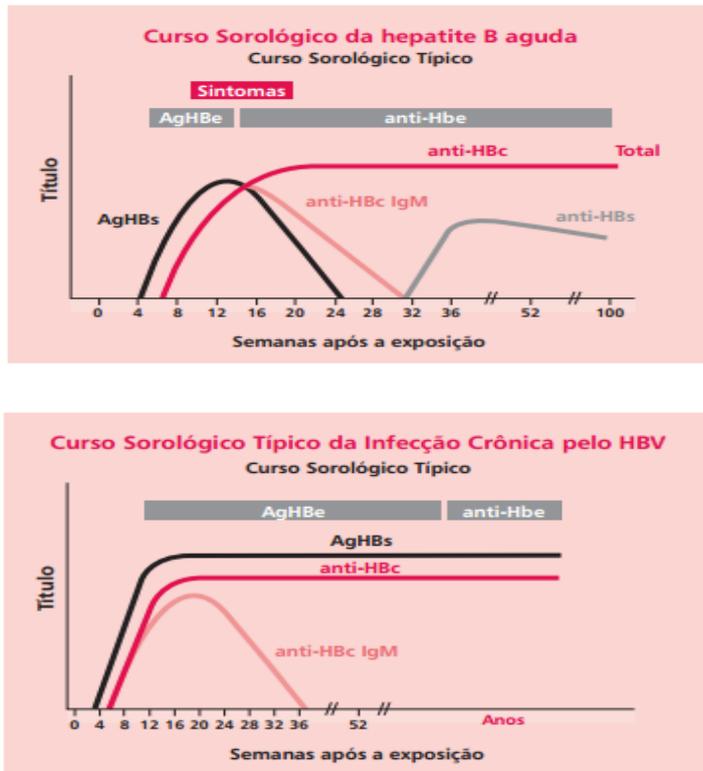
Figura 1: Mapa de prevalência da Hepatite B pelo mundo. O Brasil apresenta endemicidade intermediária com exceção da Amazônia Ocidental, onde a prevalência é de aproximadamente

20%.



Fonte: PEREIRA et.al. (2009)

Figura 2: Decurso da infecção pelo HBV (Aguda e Crônica) e seus respectivos marcadores sorológicos.



Fonte: Ministério da Saúde (2008).

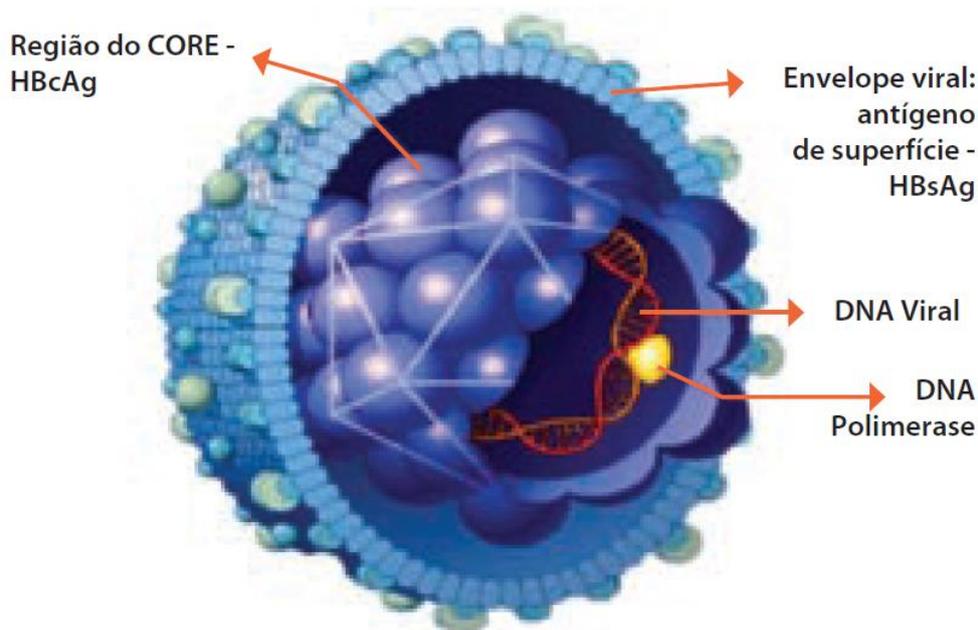
Em um breve histórico, a identificação do HBV (vírus da Hepatite B) teve início com a descoberta do seu antígeno de superfície encontrado, pela primeira vez, por Blumberg e colaboradores em 1965 sendo, na época, denominado antígeno Austrália (Au) (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965; SHERLOCK, 1970; COSSART, 1971); num estudo acerca do polimorfismo genético de proteínas séricas humanas (lipoproteínas), Blumberg e sua equipe notaram que o soro de dois hemofílicos reagia com um antígeno presente em uma amostra de soro

de um aborígine australiano, explicando daí sua nomenclatura. A partir da análise dos soros que continham o referido antígeno, o HBV foi identificado e isolado. Com os estudos da estrutura do antígeno, identificou-se que este ficava localizado na superfície do vírus, mudando, a partir de então a nomenclatura para antígeno de superfície do VHB (DANE, CAMERON, BRIGGS, 1970). Em 1973, Kaplan identificou um DNA endógeno dependente de uma DNA polimerase encontrado no interior das partículas, confirmando assim a sua natureza viral. Diante de tais dados, Robinson caracterizou o genoma do HBV em 1974 (MENDES & PITTELLA, 1994); a clonagem do DNA do HBV e a sequenciação completa do seu genoma, ocorrida em 1979, abriu novos horizontes na compreensão melhor da sua biologia e história natural (SPECTER, 1999).

De acordo com a OMS (2002), o vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae*, se utilizando do ser humano como hospedeiro natural. É um vírus envelopado e poliédrico com 42 nm de diâmetro, com genoma de DNA circular, parcialmente fita dupla com 3.200 bases. Embora seja de DNA, o HBV codifica uma DNA-polimerase que atua como transcriptase reversa e se replica através de um RNA intermediário. A estrutura complexa apresenta um invólucro externo composto por três formas de antígeno de superfície viral (HBsAg): as glicoproteínas L, M e S. O nucleocapsídeo ou *core* é constituído pelo antígeno HBcAg e HBeAg no qual circunda o genoma e a polimerase. O vírion também é denominado de partícula Dane. Outras partículas não infecciosas e incompletas são liberadas no soro. Tais partículas podem ser esféricas ou filamentosas sendo compostas apenas pelo antígeno de superfície. A detecção desses antígenos

e outras estruturas, como os anticorpos, a DNA-polimerase, demonstram o curso da enfermidade e são classificados como marcadores serológicos ou virológicos. A figura 3 mostra o HBV.

Figura 3- Vírus da Hepatite B, com suas estruturas e alguns dos marcadores sorológicos.



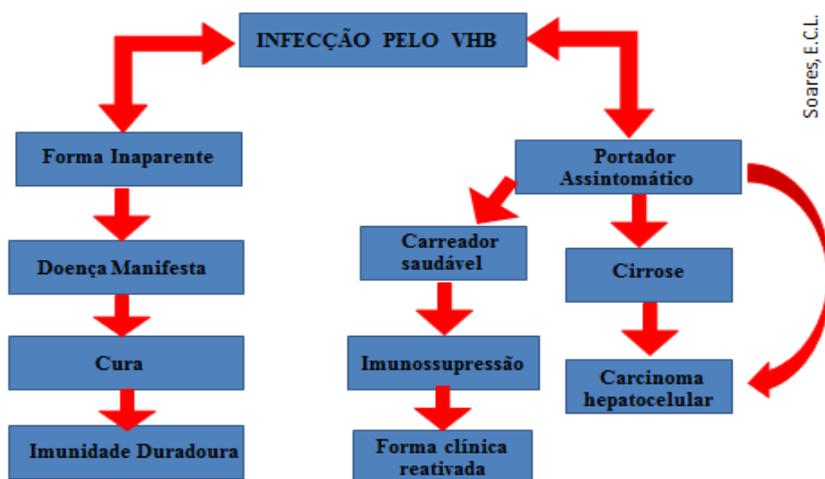
Fonte: ABCDE diagnóstico das hepatites virais Ministério da Saúde (2009).

A transmissão do HBV pode ocorrer pelas vias parenteral e sexual; a infecção promove uma complexa interação hospedeiro-vírus, podendo resultar em doença aguda, sintomática ou enfermidade assintomática. O paciente pode ser tornar imunotolerante ou desenvolver um estado de portador crônico. Outras formas de transmissão do HBV, incluem ferimentos cutâneos, compartilhamentos de seringas e agulhas entre usuários de drogas, transfusão sanguínea ou de

hemoderivados e em acidentes com materiais biológicos; uso de *piercings*, tatuagens, compartilhamento de utensílios cortantes contaminados (barbeadores, navalhas, lâminas de depilação, tesouras, alicates de unha, entre outros) (LOPES &SCHINONI, 2011). O vírus da hepatite B é bastante infectivo e sabe-se que uma só partícula é capaz de infectar. Ele inicialmente circula no sangue e replica-se nos hepatócitos com uma produção de vírions em torno de 10^{11} (100.000.000.000 cópias/ml) x por dia, enquanto o vírus da hepatite C (VHC) e da imunodeficiência (HIV), próximo de 10^9 (1.000.000.000 cópias/ml) vezes por dia. O VHB é estável e resistente ao meio-ambiente, sobrevivendo até uma semana fora do corpo humano. No plasma, a vida média varia de 1 a 3 dias, enquanto nos hepatócitos, pode variar de 10 a 100 dias. O período de incubação varia de 6 a 8 semanas (FONSECA, 2007).

Em grande parte dos casos, a hepatite B evolui para cura com o desaparecimento do quadro clínico em poucas semanas e anormalização das enzimas hepáticas em poucos meses. Essa é a forma mais comum de evolução da doença, porém existem várias rotas possíveis, as quais dividem e classificam em dois grupos: hepatite aguda e hepatite crônica (SARACENI, 2001); a figura 4 apresentam as possíveis rotas de evolução da enfermidade.

Figura 4- Organograma mostrando as vias e possibilidades de evolução do processo infeccioso por hepatite B. Em casos de portadores assintomáticos, a ocorrência de hepatite fulminante é fato raro.



Fonte: a autora.

O curso natural da infecção pelo HBV inclui 5 fases distintas baseadas na interação vírus hospedeiro: tolerância imunológica, imune ativa, inativa, crônica HBeAg negativo, clareamento de HBsAg, além da infecção oculta (Zhuang, 2012). Essas fases serão brevemente descritas (LINDEMBERG, 2013):

Imunotolerância:

Caracterizada pela presença de HBsAg e HBeAg, com níveis séricos elevados de HBV-DNA no soro e valores normais ou minimamente elevados de alanina aminotransferase (ALT); na biópsia hepática mostra fígado normal ou mínima atividade inflamatória. Geralmente, a duração da fase: 10 a 30 anos em indivíduos infectados no período perinatal; curta ou ausente nos indivíduos infectados na fase aguda;

Imunoativa:

Marcada pela positividade de HBeAg, perda da tolerância imunológica (tentativa de erradicação pelo sistema imune, dos hepatócitos infectados). Ocorrem variações nos níveis de HBV-DNA, elevação de ALT e necroinflamação hepática; nesta fase que ocorre após anos de tolerância imunológica e é a mais frequente em indivíduos infectados na fase adulta. No final desta fase, ocorre perda de HBeAg;

Portador Inativo:

Se caracteriza pela negatificação de HBeAg e queda nos níveis de HBV-DNA ou indetectabilidade; taxa de ALT normal, histologia hepática inativa. **Observação:** fazer controle dos níveis de ALT e HBV-DNA pelo menos a cada 3-4 meses;

Reativação:

Ocorre aumento de HBeAg, HBV-DNA (entre 2.000 e 20.000 UI/ml) e ALT. Surgimento da necroinflamação hepática moderada ou grave com variáveis estágios de fibrose; também se apresenta a imunossupressão do hospedeiro pelo uso de quimioterápicos, imunossupressores ou mutações virais que escapam ao sistema imune do hospedeiro;

Hepatite oculta:

Caracterizada pela perda de HBeAg, persistência de HBV-DNA em níveis baixos. Em se tratando de danos histológicos tem-se o aparecimento de injúrias hepáticas, provavelmente iniciadas em etapas anteriores da enfermidade.

Carreador saudável:

O indivíduo apresenta nesta fase, enzimas hepáticas normais, sorologia negativa para HBeAg, níveis baixos ou indetectáveis de HBV-DNA. Outras características relevantes são a presença de HBsAg por mais de 6 meses e o baixo risco para progressão cirrótica e hepatocarcinoma.

1.3.2- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL:

No que se refere ao diagnóstico laboratorial, em razão da impossibilidade de distinção das outras formas de hepatites virais, exames bioquímicos (avaliação dos níveis das enzimas hepáticas

como aminotransferases), histológicos, imunológicos (busca de antígenos e anticorpos da hepatite B) e moleculares (pesquisa quantitativa e qualitativa do DNA-HBV) devem ser realizados, afim de se avaliar o agente etiológico, o estágio, e o possível curso da enfermidade. O HBV apresenta três antígenos principais (HBs – de superfície; HBc- do core; HBe- indicador de replicação viral e presença circulante no soro), contra os quais, o sistema imunológico produz os respectivos anticorpos: anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe; tanto os antígenos como os anticorpos são classificados como marcadores moleculares. O HBsAg é o marcador característico da infecção, revelando a presença do vírus; a soroconversão para anti-HBs confere imunidade e cura. O anti-HBc é o primeiro anticorpo presente, e algumas vezes o único marcador detectado durante a evolução da infecção. O soromarcador HBeAg indica replicação viral ativa e alta infectividade. O surgimento do anti-HBe demonstra um bom prognóstico nos casos agudos (CABRAL, 2014; MENEZES, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A figura 5 mostra os possíveis diagnósticos sorológicos, de acordo com estágio da doença.

Figura 5 – Possíveis resultados sorológicos da hepatite B, de acordo com o estágio da enfermidade.

<p style="text-align: center;">Infecção Aguda</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ REAGENTE • Anti-HBc Total* ⇨ REAGENTE • Anti-HBc IgM ⇨ REAGENTE <p><small>* Altos títulos de IgM</small></p>	<p style="text-align: center;">Infecção Crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ REAGENTE • Anti-HBc Total ⇨ REAGENTE • Anti-HBc IgM ⇨ NÃO REAGENTE ou REAGENTE (reagudização) • HBeAg* ⇨ REAGENTE • Anti-HBe ⇨ NÃO REAGENTE ou REAGENTE <p><small>* Em pacientes infectados por cepas com mutação pré-core (não produtoras da proteína "HBeAg"), esse marcador apresenta-se não reagente. Nesse caso, recomenda-se avaliar a carga viral do VHB, utilizando testes de biologia molecular).</small></p>
<p style="text-align: center;">Fase Aguda Final (Convalescência)</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ REAGENTE ou NÃO REAGENTE <ul style="list-style-type: none"> • Nessa fase, ainda podem ser encontrados resíduos desse marcador sorológico, presente na fase aguda. • Anti-HBc IgM ⇨ REAGENTE ou NÃO REAGENTE <ul style="list-style-type: none"> • Marcador de infecção aguda. Nessa fase, esse marcador ainda pode ser encontrado. Acompanhar. • Anti-HBc Total ⇨ REAGENTE • Anti-HBs ⇨ REAGENTE ou NÃO REAGENTE • HBeAg ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBe ⇨ REAGENTE 	<p style="text-align: center;">Imunidade</p> <p>Imunidade por Contato Prévio com o Vírus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBc Total ⇨ REAGENTE • Anti-HBs ⇨ REAGENTE <p>Imunidade por Resposta Vacinal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBc Total ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBs ⇨ REAGENTE
<p style="text-align: center;">Infecção Passada</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ NÃO REAGENTE <ul style="list-style-type: none"> • Ocorre desaparecimento total desse marcador sorológico. • Anti-HBs ⇨ REAGENTE • Anti-HBc IgM ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBc Total ⇨ REAGENTE • HBeAg ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBe ⇨ REAGENTE 	<p style="text-align: center;">Indivíduo Suscetível*</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBsAg ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBc Total ⇨ NÃO REAGENTE • Anti-HBs ⇨ NÃO REAGENTE <p><small>* Indicado para vacinação, de acordo com as normas do Programa Nacional de Imunização - PNI</small></p>

Fonte: Ministério da Saúde, 2009.

De acordo com o anexo VIII da RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, da ANVISA, os doadores de sangue devem ser submetidos a testes sorológicos para detecção dos marcadores HBsAg e anti-HBc; essa estratégia minimiza a possibilidade de transmissão do vírus por transfusão

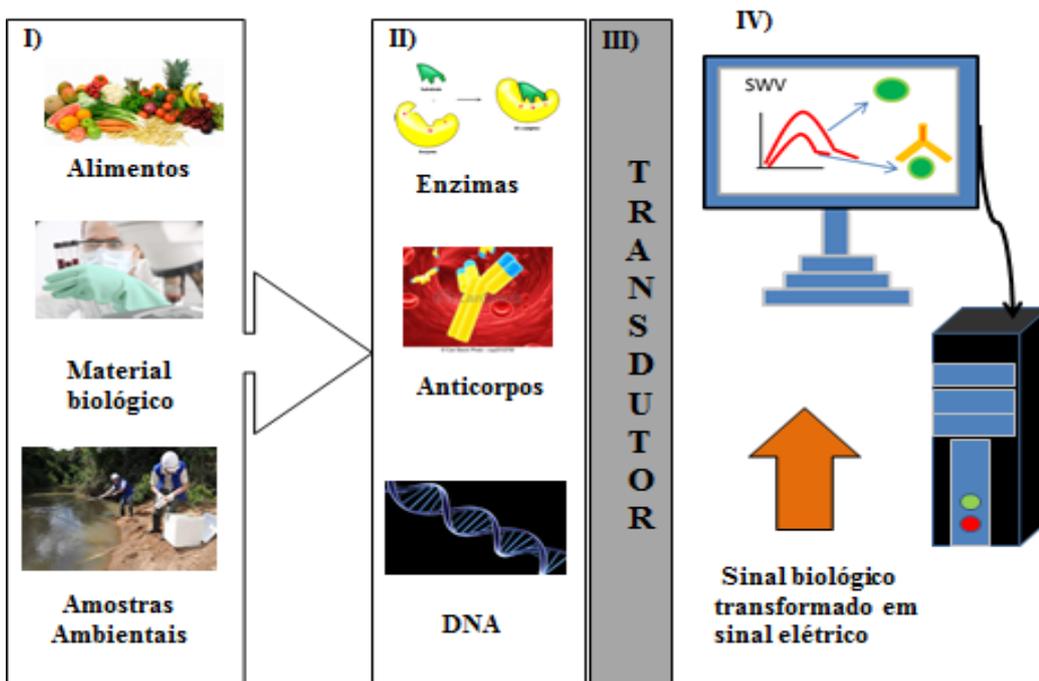
sanguínea, com rara exceção das doações realizadas no período que antecede a expressão do HBsAg, classificada de fase pré-antigenia. Mesmo com as limitações inerentes ao diagnóstico na detecção do HBsAg, adotados na triagem sorológica de doadores, um dos principais riscos são os doadores soronegativos para o HBsAg, mas que se encontram no período chamado de janela imunológica, logo após uma infecção; outros riscos incluem os portadores crônicos do VHB, com níveis indetectáveis de HBsAg e indivíduos infectados com formas mutantes do VHB (FREIRE & VASCONCELOS, 2013; LINDENBERG, 2013; FERREIRA, 2010).

3.2- BIOSSENSORES:

Métodos analíticos para identificação e determinação quantitativa e qualitativa de compostos bioquímicos são utilizados em variadas aplicações, como no diagnóstico de doenças provocadas por microrganismos, detecção de patógenos em bebidas lácteas e de substâncias químicas na defesa, segurança e monitoramento do meio ambiente. Os métodos analíticos convencionais (gravimetria, titulometria, espectroscopias de massa e Raman, interferometria, fotometria, refratometria) são bastante precisos e muito utilizados (DOGLAS et. al., 2002). Todavia apresentam, normalmente, as seguintes desvantagens inerentes à análise bioquímica: a realização é feita em laboratório; o procedimento analítico é lento, além de oneroso, com necessidade de profissionais experientes e qualificados (MOREIRA et. al., 2010). Na tentativa de elucidar ou minimizar essas desvantagens, novos métodos diagnósticos vêm sendo estudados e apresentando resultados promissores; dentre estes, os biossensores ganham destaque.

Os biossensores são dispositivos analíticos com capacidade de converter uma informação físico-química, como transformações químicas, liberação de calor, transferência de elétrons, interações biológicas (enzima-substrato/ antígeno-anticorpo) em um sinal analítico, quantitativo ou semi-quantitativo. Basicamente, o biossensor é constituído por três partes integradas: o elemento biorreceptor, um transdutor e um sistema de processamento de sinal (PERUMAL & HASHIM, 2014; VIDOTTI et.al., 2011), como pode ser visto na figura 6.

Figura 6 - Esquema representativo da construção dos biossensores. I) Tipos de analitos; II) elementos biorreceptores; III) Transdutor; IV) sistema eletrônico.



Fonte: a autora.

O biorreceptor é o componente biologicamente ativo, que interage de maneira específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico- químicos, podendo ser uma enzima, um anticorpo, fragmento de DNA, organela, célula ou até um microrganismo (VO-DINH & CULLUM, 2000). A interação pode produzir íons, elétrons, luz e calor. Assim, o receptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade e sensibilidade do biossensor; o transdutor é o elemento que percebe as alterações causadas pela interação entre o receptor biológico e seu analito e as converte num sinal analiticamente mensurável, ou seja, que pode ser eletronicamente visualizado, após amplificado e armazenado (OLIVEIRA et. al., 2013).

De acordo com a IUPAC, a classificação destes dispositivos pode ser feita pelo elemento biológico, pela forma de transdução do sinal, ou por uma combinação dos dois; se o elemento biológico for considerado, se terá o biossensor catalítico (LEI et.al., 2006; PARK et. al., 2010), (enzimas, células ou tecidos) ou de bioafinidade (antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA) (HIRST et.al., 2008; PALCHETTI & MASCINI, 2008; TELES & FONSECA, 2008). Quanto ao tipo de transdução de sinal, os sensores podem ser eletroquímicos (Amperométrico, potenciométrico e condutimétrico), piezoelétricos (variação de massa), calorimétricos (variação de temperatura) ou ópticos (colorimétrico, fluorescente e luminescente)(SOUZA, 2014).

Biossensores eletroquímicos medem as alterações elétricas do meio de acordo com propriedades como corrente, potencial, condutividade, resistência elétrica entre outras. Para o sinal ser captado e convertido em um sinal elétrico, fixa-se o elemento biorreceptor sobre uma superfície

condutora, denominada eletrodo. Os eletrodos, em geral, se constituem de metais inertes, como exemplos, ouro, carbono, carbono vítreo, ITO (óxido de estanho dopado de índio), platina, aço inoxidável, etc. Antes da imobilização dos analitos, estes eletrodos podem ser modificados com polímeros condutores ou em associação com nanomateriais que ajudam a aumentar a condutividade elétrica, como nanotubos de carbono, grafeno, e nanopartículas de ouro (SPAIN et al., 2011; KAFI & CROSSLEY, 2013; LU et al., 2014).

Em se tratando de modificação de superfícies eletródicas, os polímeros conjugados (os que possuem alternância de ligações químicas simples- sigma- e duplas- sigma e pi- ao longo de sua cadeia) têm atraído interesse para utilização como matrizes onde as biomoléculas serão imobilizadas; servem como intermediários na ligação entre receptor e analito, além de melhorarem o tempo de resposta, sensibilidade e limite de detecção (OLIVEIRA et al., 2013); outra vantagem destes polímeros é a possibilidade de sua síntese eletroquímica permitir uma imobilização de biomoléculas simples na superfície modificada do eletrodo. Relativamente, torna-se possível o controle da distribuição espacial do material imobilizado, espessura do filme e manutenção da atividade da biomolécula. Assim, o desenvolvimento de qualquer tipo de tecnologia neste campo de conhecimento é dependente da compreensão das interações a nível molecular entre a espécie biológica e a matriz polimérica (COSNIER, 2003).

Métodos baseados nos imunoenaios normalmente são utilizados para a detecção / quantificação de patógenos em alimentos, doenças provocadas por vírus, bactérias e poluentes na água destinada ao consumo. O imunoensaio diagnostica a capacidade de um anticorpo ligar-se

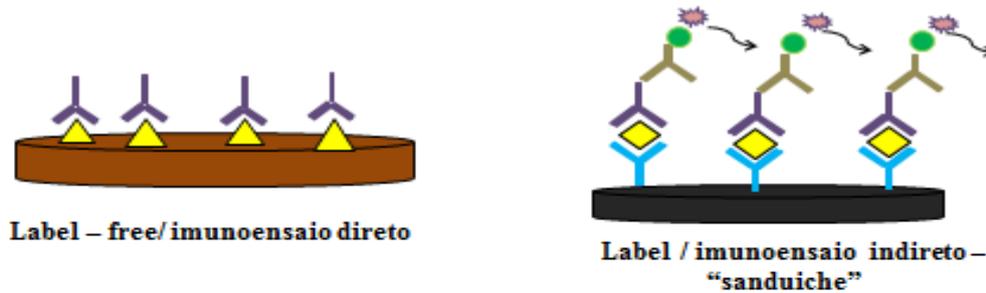
química e especificamente a uma única molécula ou um grupo muito limitado de moléculas, denominadas de antígeno. Num imunoensaio, a ligação antígeno-anticorpo, altamente específica e sensível, é utilizada para a detecção de proteínas, vírus, bactérias entre outras substâncias, presentes em uma amostra fluídica (sangue, saliva, solução aquosa, entre outras). Neste sentido, o anticorpo ou antígeno do vírus, bactéria, etc., é imobilizado e o antígeno ou o anticorpo a ser detectado é imerso ou entra em contato e uma ligação não-covalente ocorre. Para identificação e quantificação da substância em análise (analito), normalmente é associado um marcador fosforescente, luminescente, radioativo, enzimático, molecular e nanoparticular, que se liga a um substrato e geralmente uma mudança físico-química é observada, como a alteração da cor. Utilizando esse procedimento, a presença ou não do analito e a quantidade (massa ou concentração) da mesma pode ser medida (CUNNINGHAM, 2008; MOREIRA et. al., 2010). De acordo com FREITAS (2014), quando o reconhecimento do analito de interesse é dado pela formação de imunocomplexos, este biossensor recebe o nome de imunossensor. Os imunossensores resultam em respostas altamente seletivas, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a alta especificidade.

Dentre as muitas características que favorecem a utilização de um biossensor, destacam-se a especificidade, a alta sensibilidade, a capacidade de resposta que conduz a curto tempo de análise, capacidade de inclusão do mesmo em sistemas integrados, facilidade de automação, capacidade de trabalho em tempo real, a versatilidade e o baixo custo.

3.2.1 - IMUNOSSENSORES

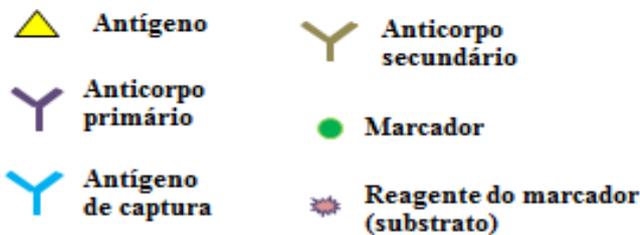
Os transdutores eletroquímicos, em especial, os amperométricos, têm se destacado no desenvolvimento de imunossensores para diagnóstico clínico, devido a sua alta sensibilidade, baixo custo e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação. O princípio da transdução de sinal em sensores amperométricos é baseado na medida de uma corrente elétrica que seja diretamente proporcional à concentração da espécie de interesse (analito) (RAHMAN et al., 2010). Durante as medidas amperométricas, é mantido um potencial constante entre o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo de referência (ER). A corrente gerada por processos de oxidação e redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho é mensurada e o sinal gerado é diretamente proporcional a concentração das espécies eletroativas (SILVA, 2014). O monitoramento da corrente elétrica pode ser feito através do uso de marcadores da reação, tendo em vista que a reação é de afinidade entre antígeno e anticorpo, se assemelhando ao imunoenensaio enzimático (ELISA). Assim, o antígeno ou o anticorpo podem ser marcados com fluoróforos, partículas magnéticas, quantum dots ou enzimas e estes são conhecidos como conjugado; a medida da corrente será correlacionada em função do produto da reação enzimática, após a adição do substrato na célula eletroquímica. Imunossensores seguem o mesmo princípio dos biossensores catalíticos, porém a determinação do analito, baseia-se na formação de imunocomplexos e não na reação enzimática como enuncia THÉVENOT et.al. (2001) e RICCARDI et.al. (2002). A figura 7 mostra imunoenensaio marcados (labeled) e não marcados (Label-free).

Figura 7 – Imunoensaios livres de marcação e marcados.



Label - free / imunoensaio direto

**Label / imunoensaio indireto -
"sanduiche"**



Soares, E. C. L.

Fonte: A autora.

A literatura apresenta trabalhos que utilizam marcadores na detecção de analitos de interesse; porém na atualidade, a detecção de biomoléculas em ausência de marcadores tem crescido consideravelmente (DIAS, et. al., 2013; GOMES-FILHO, et.al., 2013). Este formato de biossensor oferece algumas vantagens como redução nos resultados falso- positivos, custo reduzido da análise, detecção em tempo real, redução nas etapas de manipulação, entre outras.

Para o bom funcionamento de um imunossensor, a escolha adequada do método de imobilização da biomolécula é primordial (VIDOTTI et. al., 2011); ela permite o controle de

propriedades como estabilidade, tempo de estocagem, sensibilidade, seletividade, tempo de resposta e reprodutibilidade. Outra questão a ser destacada, envolve a manutenção da estrutura, função e atividade biológica da biomolécula após a imobilização, necessária para um biossensor eficaz (AUJA et.al.2007).

Dentre os vários protocolos de imobilização, alguns são descritos e ganham destaque como adsorção, ligação covalente, encapsulamento, ligação cruzada ou de interação eletrostática. Adsorção, seja física ou química é um método simples que requer pouca preparação; através de ligações entre um grupo funcional da biomolécula e a superfície do eletrodo modificada, consegue-se controlar o referido processo com mais eficácia (BUCKO et.al.; SASSOLAS et.al., 2012). Porém, no que se refere a adsorção, em caso de ser física, ocorre de maneira fraca e sendo química, se realiza de maneira desordenada, o que não pode garantir um sistema estável. Já no encapsulamento, a biomolécula a ser imobilizada está envolvida por membrana que impede sua contaminação e deterioração, pode proteger contra mudanças de temperatura, pH, força iônica e composição química; uma variante desse processo pode ser o encapsulamento numa matriz gelificada, a qual poderá dificultar a difusão do analito e causar a perda da funcionabilidade. Isto certamente afetará as qualidades do biossensor. Outra possibilidade é a imobilização de biomoléculas em nanosestruturas de polímeros conjugados, os quais, elaborados por diversas rotas químicas e físicas, podem auxiliar no controle da interface híbrido-polímero/ elemento biológico a nível molecular, como relatado por OLIVEIRA et.al. (2013). As últimas pesquisas também

apresentam a elaboração de matrizes poliméricas adicionadas com nanomateriais como nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas metálicas, entre outras.

Recentemente, para conseguir uma melhor apresentação do elemento de reconhecimento para o analito alvo, tem sido introduzida a utilização de camadas ordenadas sobre a superfície do eletrodo. Neste caso, o material de eletrodo mais utilizado é ouro (quer como tela impressa ou haste tradicional), que permite a formação de monocamadas auto-montadas (SAMs), através da química tiol-ouro de forma muito reprodutível e ordenada. Nesta perspectiva, o procedimento de imobilização geralmente envolve duas etapas separadas. O primeiro é a criação de SAM com um agente de ligação contendo um tiol numa das extremidades e um grupo funcional (de ácido carboxílico, amina, etc.) para uma reação conveniente, com o elemento de reconhecimento, na outra extremidade. O segundo passo envolve a reação do elemento de reconhecimento com o grupo funcional do agente de ligação geralmente através de ligações covalentes (tais como ligações amida e formação da base de Schiff's) diretamente com a monocamada funcionalizada ou com a ajuda de moléculas de ponte tais como o glutaraldeído. O uso de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) ou de grupo succinimida por si só também encontrou várias aplicações. A monocamada resultante é bem orientada sobre a superfície do eletrodo e esta permite uma melhor ligação anticorpo / antígeno (RICCI et.al., 2012).

3.3 – ELETRODOS IMPRESSOS

Visando atingir os principais requisitos para construção de um biossensor como seletividade, sensibilidade, estabilidade, portabilidade, produção em larga escala, precisão entre outros, a técnica de “screen-printed” ou “silk- screen”, tem sido utilizada com resultados bastante promissores.

Eletrodos impressos ou “screen-printed electrodes”, são constituídos por filmes depositados sobre um suporte inerte, geralmente de PVC (Cloroeto de polivinila), cerâmica e atualmente utilizando outros materiais, parcialmente coberto por uma segunda camada de material isolante para definir as áreas de contato elétrico e superfície do eletrodo. Estes filmes são produzidos através de diferentes procedimentos, com destaque para os processos de “screen- printed” ou “silk- screen”. Tais estratégias possibilitam a produção de eletrodos em massa, a um custo extremamente baixo, simples, rápido e versátil, sendo apropriadas para a confecção e miniaturização de eletrodos descartáveis. Nos tempos atuais, é comum a produção de sistemas completos, com os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar impressos no mesmo suporte (FÉLIX, 2009).

O desenvolvimento de um sistema miniaturizado não é simplesmente a transferência de um ensaio realizado na escala macro para a escala micro. Com a redução das dimensões geométricas, vários aspectos devem ser considerados, para se obter uma boa performance (COLTRO, 2004). Assim, as dimensões miniaturizadas de eletrodos impressos, todos os passos para sua montagem, podem ser executados com pequenas quantidades de soluções, reduzindo assim o consumo de reagentes. Já se encontram disponíveis no mercado, eletrodos impressos de ouro, carbono (RICCI et.al., 2012).

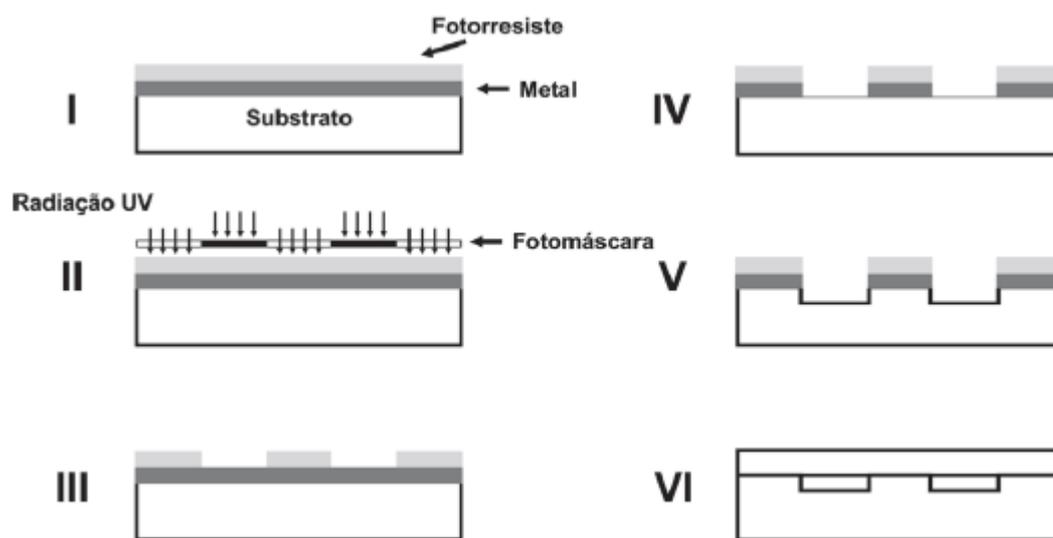
Nesse contexto, a busca por métodos diagnósticos que viabilizem o atendimento do paciente sem a necessidade de grandes deslocamentos, em ambientes hostis ou de recursos escassos, utilizando produtos biológicos de fácil obtenção como sangue, urina ou saliva e obtendo os resultados da análise em pouco tempo, sem a necessidade de maquinário sofisticado, originou os dispositivos “point-of-care”, também conhecidos pela sigla POCT, que deriva do inglês (point-of-care testing) e significam testes realizados junto ao paciente, como relatado por MENEZES (2014). Utilizar dispositivos portáteis torna-se ferramenta útil ao médico, já que o mesmo pode realizar o teste de acordo com a necessidade clínica, o que permite análise mais rápida do quadro em que se encontra o paciente, determinando seu diagnóstico ou indicando-o à monitorização. Importante lembrar que esses testes não substituem os exames laboratoriais já padronizados, servindo como auxiliar na obtenção do diagnóstico. (SCRIVASTAVA, et.al., 2011; TEIDMAN et.al., 2010).

A miniaturização de dispositivos eletrônicos, a partir da década de 60, provocou uma verdadeira revolução na eletrônica e na informática. O rápido desenvolvimento de sistemas miniaturizados, nos mais diferentes campos de pesquisas, tem dominado o progresso da tecnologia moderna; dessa mesma forma, os microchips analíticos tem revolucionado a química analítica e também a busca por diagnósticos mais precisos e confiáveis (MADOU, 2002; DITTRICH,et.al., 2006).

De acordo com WANG, et.al. (2009), certo conjunto de processos podem ser combinados para elaboração e construção de eletrodos descartáveis. Na prática, é comum que o dispositivo eletroquímico, composto por dois ou três eletrodos, seja completamente descartável ou apenas o

eletrodo de trabalho, conservando-se os outros elementos para as análises subsequentes. Dentre esses processos, a fotolitografia é um dos que tem sido bem utilizados. Esse procedimento permitiu a realização de muitos experimentos eletroquímicos antes do desenvolvimento da microeletrônica. No processo fotolitográfico, o substrato, sobre o qual o dispositivo é fabricado, é recoberto com uma resina polimérica fotossensível, também conhecida por fotorresiste; a mesma é exposta à radiação, geralmente a ultra-violeta, por meio de uma máscara ou sequência delas. O formato desejado é obtido durante a etapa de revelação; as áreas do fotorresiste que permanecem após a revelação, protegem algumas regiões do substrato. As regiões expostas podem ser submetidas a uma variedade de processos aditivos ou subtrativos, com o objetivo de criar um modelo ou padrão no substrato (PASSOS, 2010). Quando se refere à natureza do fotorresiste, as cadeias poliméricas nas regiões expostas à radiação podem sofrer uma reticulação e se tornarem insolúveis (fotorresiste negativo) ou podem sofrer uma degradação e se tornarem solúveis (fotorresiste positivo). Dependendo da característica do fotorresiste, há a necessidade de etapas de tratamento térmico antes e depois da fotogração, de modo a eliminar qualquer presença de solvente e reduzir o estresse intrínseco do material (COLTRO et.al., 2007). A figura 8 faz um resumo do referido processo.

Figura 8 – Etapas de construção de microdispositivos pelo processo fotolitográfico. Em I: disposição do filme metálico sobre o substrato; II: posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; III: revelação da imagem fotografada no fotorresiste; IV: corrosão de regiões da camada metálica não protegida pelo fotorresiste; V: corrosão do substrato transferindo a configuração para os microcanais; VI: remoção de camadas: fotorresiste, metal e selagem do microdispositivo.



Fonte: Coltro et.al. (2007).

Associar tecnologias de produção em massa, com recursos de modificação de eletrodos, como incorporação de materiais como enzimas, membranas, mediadores, materiais catalíticos, resultou na elaboração de inúmeros sensores descartáveis, como por exemplo, o biossensor para

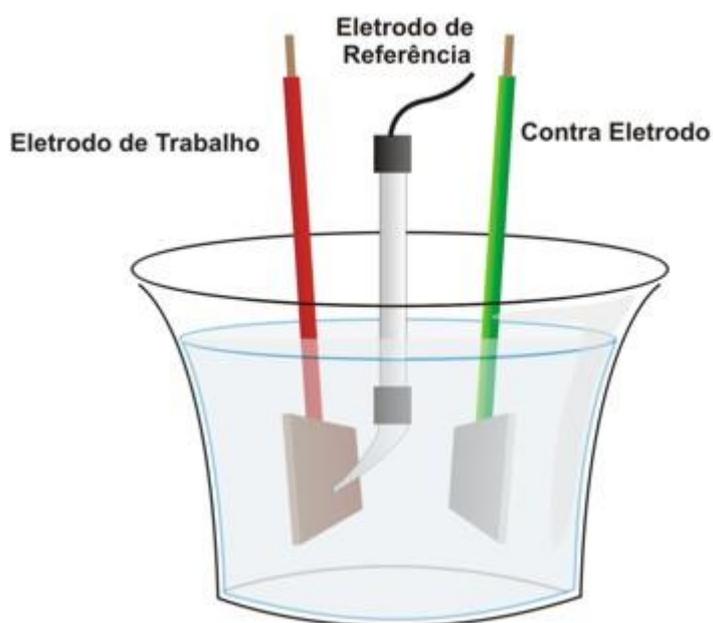
glicose (TROJANOWICZ & HITCHMAN,1996) hoje comercialmente disponível; mesmo diante dos muitos avanços, nota-se a necessidade do aprofundamento dos estudos e o leque de possibilidades que se abre, diante das descobertas de formulações para elaboração de tintas, inclusão de novos materiais na composição dos filmes e processos de imobilização de biomoléculas.

3.4- MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

A eletroquímica avalia a inter-relação existente entre fenômenos físicos e químicos, associados à transferência de elétrons que podem ocorrer homogeneamente em solução ou heterogeneamente na superfície do eletrodo. Um processo eletroquímico pode ser exemplificado por uma reação química que gera um fenômeno elétrico, como uma pilha ou um fenômeno elétrico que induz a uma reação química como um processo de eletrodeposição. Neste processo são medidas alterações de corrente, potencial, condutância, impedância, capacitância, entre outras. Os experimentos são realizados dentro de uma célula eletroquímica, composta por três eletrodos: Eletrodo de referência (ER), que mantém a diferença de potencial em relação ao eletrodo de trabalho, o Contra Eletrodo (CE), utilizado para descarga de sobrepotência no eletrodo de trabalho e o Eletrodo de Trabalho (ET), onde ocorrem os processos eletroquímicos de interesse; a técnica eletroquímica é importante ferramenta que oferece opções viáveis para mediar problemas na elaboração de novos métodos diagnósticos, modificações de superfície, apresentando em suas vantagens, a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises, fácil controle das variáveis que combinadas de maneira variada, conduzem a técnicas eletroquímicas particulares como voltametria cíclica (VC),

voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (VPD), dentre outras (BARD & FAULKNER, 2010; SANTOS, 2012; CABRAL, 2014 ; MENEZES, 2014).

Figura 9 - Ilustração representativa de uma célula eletroquímica num sistema de três eletrodos.



Fonte: PUC- Rio

5.1- VOLTAMETRIA

5.1.1- Cíclica

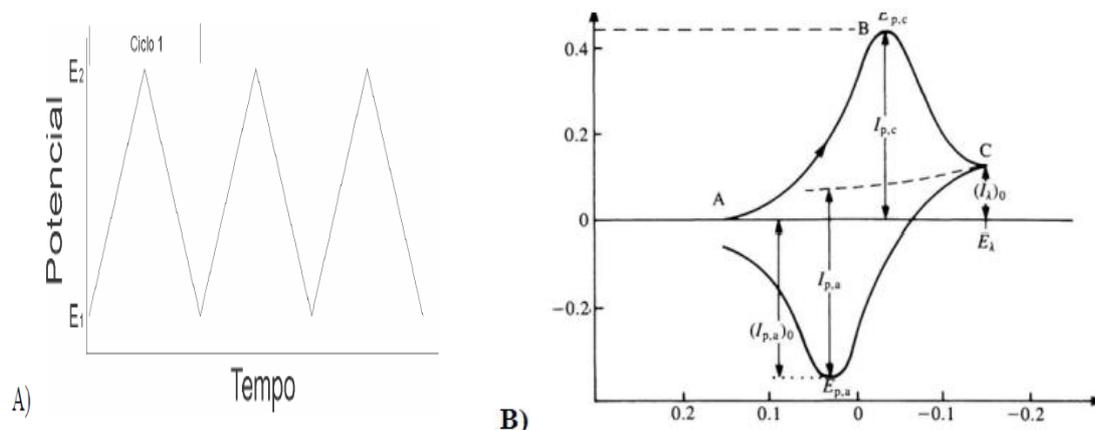
Reúne um grupo de métodos eletroanalíticos, onde as informações acerca da concentração do analito derivam das medidas de corrente em função do potencial aplicado nas condições de

completa polarização do eletrodo de trabalho, através do uso de microeletrodos; a aplicação deste potencial no eletrodo de trabalho dá origem a duas frações de corrente: faradaica (I_F), diretamente relacionada com transferência de carga e capacitiva (I_C), que auxilia na organização de moléculas e íons presentes na dupla camada do eletrodo (SILVA; MENEZES, 2014).

Na modalidade da voltametria cíclica (VC) são realizadas varreduras de potenciais no sentido anódico ou catódico, sob uma velocidade de varredura constante, até um determinado valor, a partir do qual tem-se o processo invertido no sentido da varredura de potenciais. Durante a varredura direta, observa-se processos de oxidação ou redução; após a varredura inversa, observam-se processos decorrentes da reação das espécies geradas na varredura direta, conforme a reversibilidade da reação eletroquímica em estudo (OLIVEIRA, 2008).

Utilizando-se da VC, pode-se obter informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A resposta em corrente, é obtida quando se submete o eletrodo de trabalho a uma onda triangular de potencial, o qual, é variado linearmente com o tempo, com valores inicial e final determinados. Desta maneira, gera-se um gráfico de corrente em função da variação do potencial, conhecido como voltamograma cíclico, como pode ser visto na figura 10.

Figura 10 – Princípio da Voltametria Cíclica (VC). Em A: potencial variando com tempo; em B: perfil de um voltamograma cíclico num sistema redox reversível.



Fonte: Menezes, 2014.

Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico ($E_{p,c}$) e anódico ($E_{p,a}$), e as correntes de pico catódico ($I_{p,c}$) e anódico ($I_{p,a}$) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência eletrônica. Para uma reação reversível, as $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ são aproximadamente iguais em valor absoluto, a diferença entre os E_p é aproximadamente 59 mV (milivolts) e é independente da velocidade de varredura. Já nos sistemas irreversíveis observa-se uma completa ausência de picos de oxidação e redução reversos e deslocamentos do E_p em relação à velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

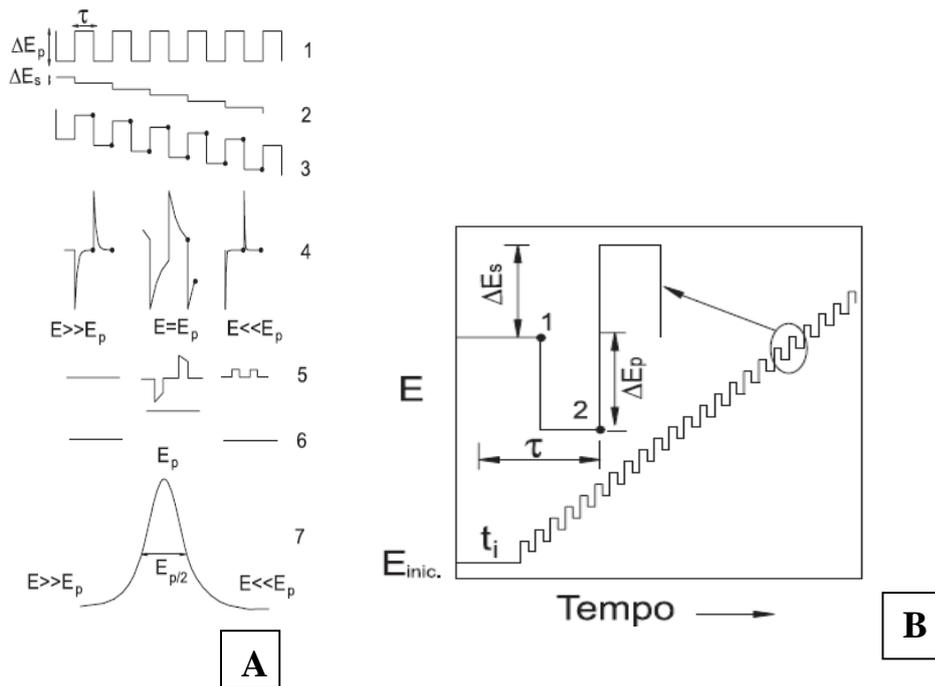
Na construção dos testes diagnósticos, a voltametria cíclica tem importante papel, por apresentar informações relevantes do sistema como potenciais de oxidação e redução da espécie, reversibilidade e irreversibilidade da transferência eletrônica, presença de reações químicas acopladas, adsorções e fenômenos catalíticos; ainda se pode caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico. Essas informações geralmente estão descritas de acordo com o gráfico voltamétrico gerado (FREITAS; CABRAL, 2014).

5.1.2- Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “SquareWave Voltammetry”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletrodico em estudo (SOUZA et.al., 2003).

O princípio básico é a forma do pico de corrente resultante ser proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado, como mostra a figura 11.

Figura 11 - Representação da Voltametria de Onda Quadrada. **Em A:** 1) potencial na forma de onda; 2) Escada de potencial; 3) Forma de aplicação do potencial na SWV; 4) Forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) Corrente diferencial; 7) Corrente total; **em B:** aplicação do potencial na Voltametria de Onda Quadrada.



Fonte: Souza et.al. 2003.

Em termos práticos, uma das vantagens da SWV é a possibilidade da obtenção de correntes de pico bem definidas, mesmo em leituras realizadas a altas velocidades de varredura trazendo assim, melhoria significativa à técnica. Por ser uma técnica de pulso, a corrente faradaica pode ser coletada

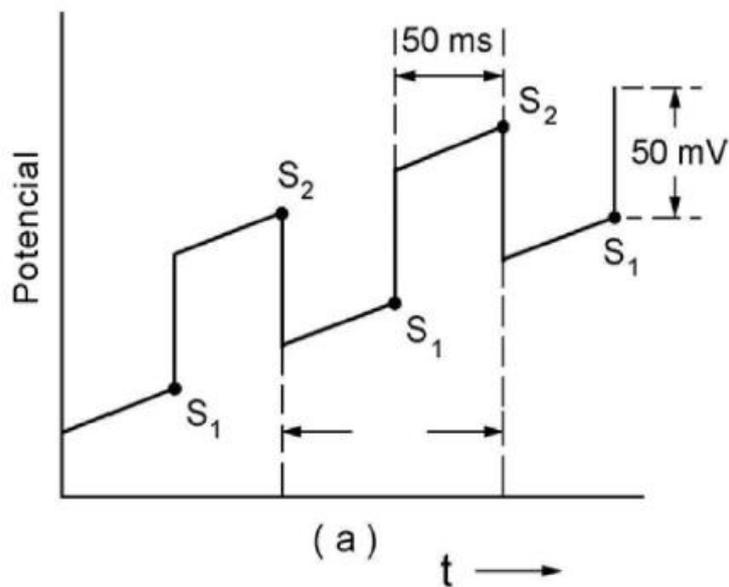
em intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente capacitiva tenha se minimizado. Outro ponto favorável a utilização dessa técnica é a redução no ruído de fundo por meio de repetidas varreduras; ainda permite, através da observação dos sinais das varreduras direta e inversa, se obter informações análogas às aquelas obtidas através da VC, porém com maior sensibilidade, por conta da minimização da contribuição da corrente capacitiva (SOUZA et.al., 2004; CARIDADE, 2008).

5.1.3 – Pulso Diferencial

Nesta modalidade de voltametria, a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, sendo que a sistemática para a variação de potencial segue uma seqüência de pulsos de potenciais, cujas respostas de corrente obtidas dependem de como estes pulsos são aplicados. Exatamente a diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que define as características básicas de cada uma destas técnicas (OSTERYOUNG & SCHREINER, 1988); pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica e, então, plotadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal

obtido, pois a corrente capacitiva não depende da concentração da espécie em estudo (SOUZA et.al., 2003). Pelos princípios da técnica, a corrente é lida em dois momentos, no início (S1) e no final do pulso (S2). A corrente plotada no gráfico *versus* o potencial aplicado é a variação entre a corrente capacitiva (S1) e a corrente faradaica (S2), isto é, a corrente final é produto da subtração das duas correntes, eliminando possíveis ruídos (SOUZA, 2014). A figura 12 apresenta o gráfico.

Figura 12 - Voltametria de pulso diferencial (VPD). Mensuração de sinal de corrente livre de ruído.



Fonte: Souza, 2014.

6- NANOTECNOLOGIA NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES:

6.1- NANOMATERIAIS: NANOTUBOS DE CARBONO

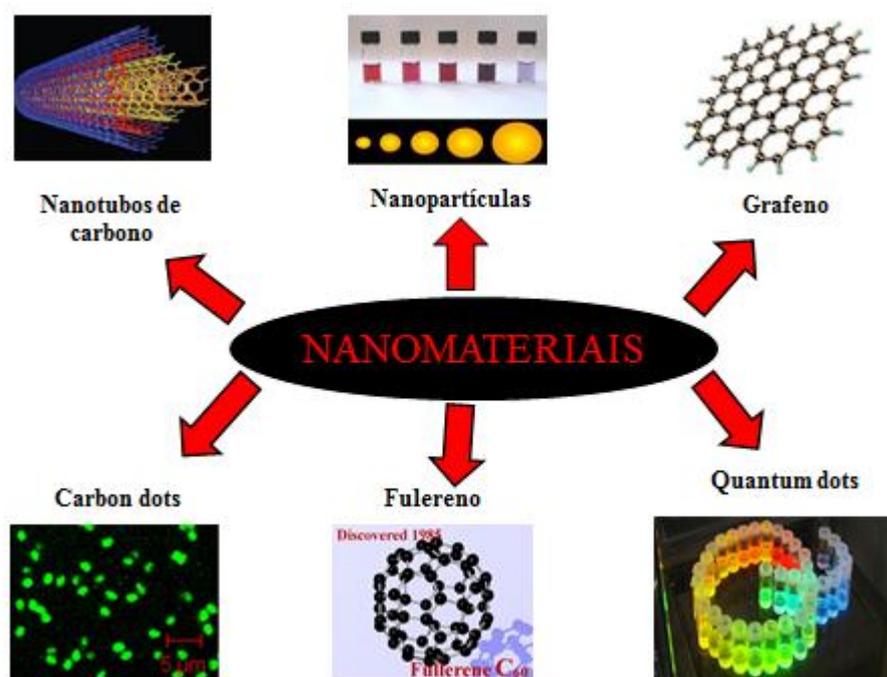
A constante busca por materiais cada vez menores e com características específicas como resistência, biocompatibilidade e condução elétrica tem sido um dos principais objetivos na área tecnológica. Como resultado, nos últimos anos, novas técnicas foram descobertas e aplicadas para fabricação de materiais em escala atômica ou, melhor dizendo, em escala nanométrica (PEREIRA,2009).

Numa breve introdução, observa-se que a nanotecnologia é um campo tecnológico e científico multidisciplinar que vem se desenvolvendo de maneira veloz. Pesquisas, nas mais variadas áreas, como química, biologia, engenharia, elaboram novos materiais se utilizando da nanotecnologia; nesse contexto, unem-se propriedades como a grande área de superfície e o tamanho do material reduzido a escala nanométrica, oferecendo ao novo material, características únicas e que viabilizam sua aplicação nos mais vastos setores.

A nanotecnologia cria, fabrica, manipula estruturas e partículas em escala nanoscópica (CHAN, 2006). Uma de suas vantagens é apresentar materiais com propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas macro (BERGMANN, 2008), tornando-os mais reativos e as reações químicas mais numerosas, além de proporcionar novas propriedades para este material a partir da funcionalização de diferentes componentes

(CHAN, 2006). Como relatado por Sahoo et.al.(2007), o prefixo “nano” corresponde à escala de medida onde um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo do metro (10^{-9}). Diante dessa dimensão, recebem a nomenclatura de nanomateriais, existindo vários exemplos, como pode ser visto na figura 13.

Figura 13 – Alguns exemplos de nanomateriais. Cada um apresenta propriedades, potenciais e aplicações variados, dentre estas a modificação de superfícies de biossensores, proporcionando aumento da área eletroativa.



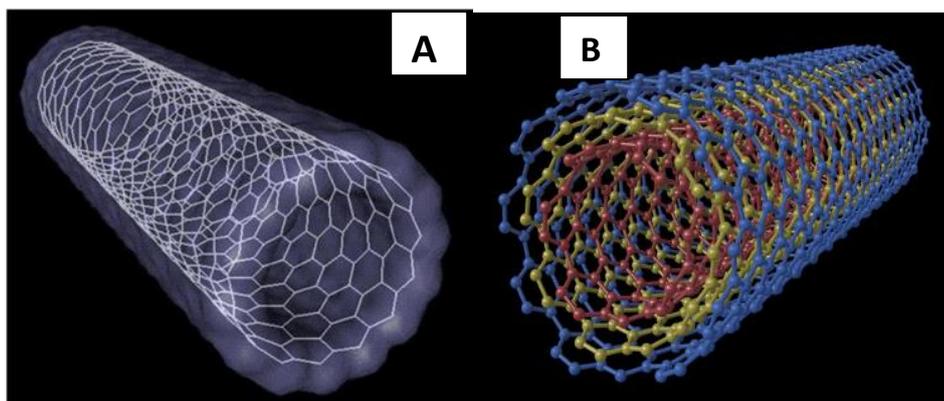
Fonte: A autora.

Um dos nanomateriais que ganhou destaque e importância na tecnologia “nano”, foram os nanotubos de carbono (NTCs), obtidos em 1991 por Iijima, pela pirólise de grafite em plasma sob

atmosfera controlada de hélio. Um fato curioso é que já em 1889, nos termos de uma patente, foi relatado que filamentos de carbono poderiam se originar de hidrocarbonetos em cadinhos de metal sob altas temperaturas; eventos anteriores como a descoberta dos fulerenos em 1985 por Kroto, Smalley e Curl, abriram as fronteiras não só na química e física do carbono, como também nanobiotecnologia (IIJIMA,1991; HUGHES&CHAMBERS, 1985).

Os nanotubos são constituídos por arranjos hexagonais de carbono, distribuídos em folhas de grafeno, enroladas no formato de cilindros com diâmetros na ordem de nanômetros e comprimento variando de nanômetros a centímetros. Os referidos cilindros são fechados como uma espécie de abóbada de carbono, a qual é resultado da inclusão de pentágonos na estrutura hexagonal da parede de grafeno durante a síntese (MERKOÇI et.al., 2005). Estruturalmente falando, existem dois tipos de NTC: os **nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT)** do inglês-*Single-Walled Carbon Nanotubes*, caracterizados por folha única de grafeno enrolada sobre si mesma, formando um tubo cilíndrico e os **nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)**, do inglês-*Multi-Walled Carbon Nanotubes*, caracterizados por três ou mais cilindros de grafeno, enrolados sobre si, (MORAES, 2010), como pode ser visualizado na figura 14.

Figura 14- Tipos de estruturação dos nanotubos de carbono. Em A) nanotubos de parede simples; em B) Múltiplas paredes.



Fonte: lqes.iqm.unicamp.br www.brasilecola.com. respectivamente.

De acordo com Silva e Freitas (2014), esse material apresenta uma das mais simples composições químicas e configurações eletrônicas e isso mostra uma diversidade de aplicabilidades entre os nanomateriais. Desde sua descoberta, são objetos de investigação e análise em razão de propriedades como estabilidade química e térmica, tamanho do diâmetro, quiralidade dos átomos de carbono, disposição dimensional; isto o viabiliza para uso em diversas aplicações, além das características de condutividade ou semicondutividade.

De acordo com Silva et.al. (2013), os nanotubos de carbono têm atraído considerável atenção devido às suas extraordinárias propriedades, incluindo a sua capacidade para mediar as

reações de transferência de elétrons e para aumentar a área superfície do eletrodo. A primeira aplicação dos nanotubos em biossensores data de 1996 por Brito et.al. (1996). Gomes- Filho et. al. (2013) propuseram CNT's como sugestão alternativa para a detecção de soro cTNT com baixo limite de detecção, embora a conjugação de peroxidase e de anti-cTNT foi necessária para obter o sinal amperométrico; recentemente Zelada-Guillén et.al. (2010), demonstraram a detecção não marcada e rápida identificação de bactérias que vivem em níveis de concentração de 6 ufc (unidades formadoras de colônia) / ml em matrizes complexas, tais como leite ou 26ufc / ml em suco de maçã, utilizando biossensor potenciométrico com aptâmeros, baseado em SWNT ; García Aljaro et.al.(2010), também demonstraram a utilidade dos SWNT utilizados em imunossensores rápidos para a detecção de agentes patogênicos da *E. coli* O157: H7 e o bacteriófago T7. Outras aplicabilidades deste nanomaterial são relatadas por RIVAS et.al. (2007) e HEDGE et.al. (2009), como uso em eletrodos para supercapacitores e sensores, ponteiros para microscopia de varredura por sonda, transistores de efeito de campo, retificadores eletrônicos.

Vantagens desconhecidas da aplicabilidade dos nanotubos de carbono ainda podem ser descobertas; a dificuldade reside na obtenção dos mesmos dispersos. Uma alternativa para facilitar, foi a funcionalização das paredes dos NTC's; o referido processo pode torna-los seletivos, havendo a correta conjugação de grupos reativos como os ácidos carboxílicos e as aminas, o que viabiliza a imobilização e os tornam mais estáveis na superfície do eletrodo. Isso os tornam potenciais ferramentas no desenvolvimento de biossensores, em que as ligações de materiais biológicos são o objetivo principal (SILVA, 2014).

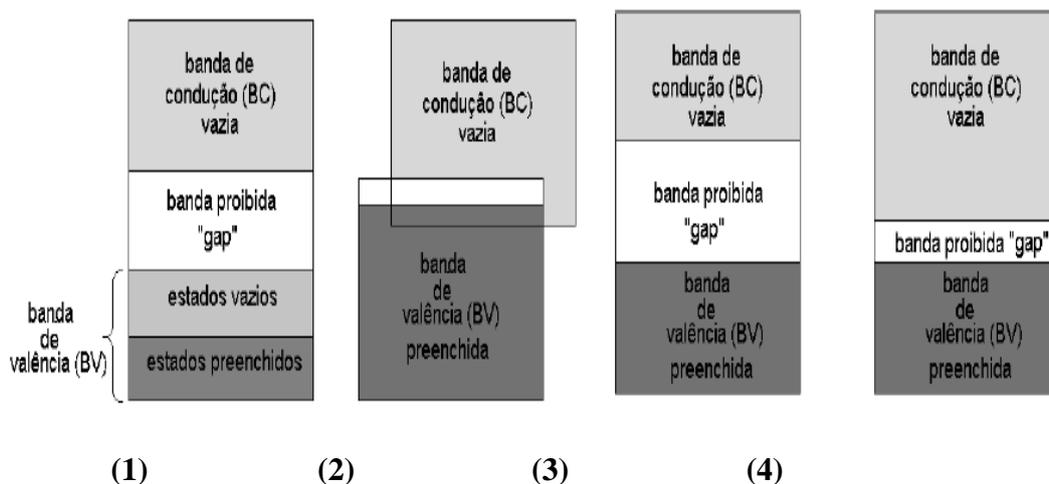
7- FILMES POLIMÉRICOS:

A palavra polímero se origina do grego poli =muitos + meros =iguais. São macromoléculas que se formam pela repetição de muitas unidades químicas iguais, os meros. As massas molares dos polímeros podem ser da ordem de centenas de milhares de unidades de massa atômica (DE PAOLI, 2008). Dentre as várias classificações, os polímeros podem ser orgânicos (constituídos basicamente de carbono e hidrogênio ligados entre si por ligações covalentes), os quais se apresentam com baixa densidade, pequena resistência à temperatura, baixas condutividades elétrica e térmica; já os inorgânicos não possuem necessariamente átomos de carbono em sua cadeia principal, que pode ser constituída por elementos como silício, fósforo, oxigênio dentre outros (ONOFRE, 2014). Muitos materiais podem ser utilizados para a elaboração de filmes a serem depositados na superfície dos eletrodos, servindo de base à ancoragem de biomoléculas; podem se originar de muitas fontes, se caracterizam pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional.

Numa tentativa simplificada de entendimento dos processos que envolvem os mecanismos de condução eletrônica desses materiais, faz-se necessário recordar princípios de física do estado sólido e a teoria das bandas. Neste contexto, um agregado de átomos quando forma um sólido, promove a subdivisão dos orbitais em estados energéticos discretos e muito próximos; convém lembrar que pelo princípio da exclusão de Pauli, dois elétrons de mesmo spin, não podem ocupar o mesmo nível de energia. Esses estados energéticos formam bandas de energia com forma e largura que dependerão do tipo de átomo envolvido e de sua distância de equilíbrio; os elétrons são alocados a partir de estados de menor energia e o maior nível de energia que podem ocupar, recebe

a denominação de nível de energia de Fermi. Diante dessa distribuição eletrônica, encontram-se bandas de energia totalmente vazias ou parcialmente preenchidas, sendo classificadas em: Banda de valência(BV)- aquela que contém os elétrons no maior estado energia e Banda de condução (BC)- níveis eletrônicos vazios e de menor energia; Banda proibida- espaço, hiato de energia ou “ gap” de energia; nesta última, os estados de energia não são ocupados por elétrons. Assim, o comportamento elétrico de certo material, é resultante da sua estruturação de bandas. A figura 15 esclarece a respeito destes mecanismos de condução (CALLISTER Jr., 1996; MACDIARMID, 2001; NÓRDEN & KRUTMEIJER, 2000; MEDEIROS et.al., 2012).

Figura 15 – *Representação esquemática da configuração de bandas de energia. Em (1), banda de valência parcialmente preenchida (característica dos metais que apresentam um elétron no subnível s- cobre); (2) BV totalmente preenchida com sobreposição da banda de condução (BC) (comum quando há superposição de subníveis durante a ligação química, como no magnésio metálico); (3) BV totalmente preenchida e uma banda larga de energia proibida separando-a da BC (própria dos materiais isolantes); (4) BV totalmente preenchida e uma banda estreita de energia proibida separando da BC (aqui se encontram o semicondutores).*



Fonte: MEDEIROS et.al. (2012).

O primeiro polímero orgânico condutor (polianilina) foi obtido já na segunda metade do século XIX. Até o início da década de 70, acreditava-se que os materiais orgânicos (incluindo os polímeros) tinham comportamento de isolantes ou semicondutores, com exceção de alguns cristais orgânicos; no início dessa mesma década, um polímero inorgânico explosivo, o poli (nitreto de enxofre) foi descoberto. Desde então, muitos condutores orgânicos foram descobertos, porém o poliacetileno foi o primeiro polímero condutor que realmente projetou essa nova classe de materiais em escala mundial (MEDEIROS et.al., 2012).

A utilização de polímeros conjugados em sensores é uma das aplicações crescentes nos últimos anos; isto se deve à possibilidade do uso de suas propriedades elétricas, eletroquímicas e óticas para converter informações químicas e físicas, como concentração, atividade num sinal analiticamente mensurável (MÜELLER et.al.,2010; MEDEIROS et.al, 2012). Na escolha de uma plataforma para elaboração de um biossensor, análises das propriedades físicas e químicas,

capacidade de regeneração do material, área superficial, permeabilidade, insolubilidade, morfologia, composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência mecânica e custo, devem ser realizadas; se classificam como orgânicos ou inorgânicos e de acordo com a morfologia dos referidos materiais, podem se apresentar como porosos, não porosos e géis. Assim, o surgimento de filmes oriundos de fontes renováveis e naturais, como os biopolímeros tem sido alvo de estudos e pesquisas; em comparação com os filmes sintéticos, apresentam as vantagens de baixo custo e fácil degradação sem danos ao ambiente, como relatado por MENDES et.al. (2011).

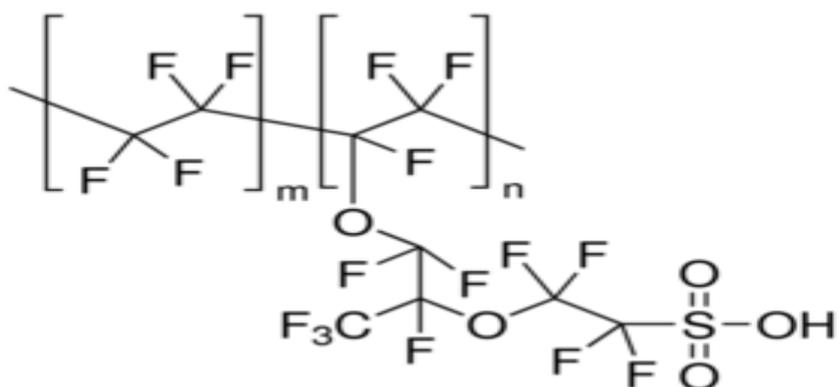
7.1 – NÁFION

No ano de 1970, as membranas perfluoro nomeados Nafion® foram desenvolvidos pela Dupont de Nemours Company. São produto da copolimerização de um co-monômero de éter vinílico perfluorado com tetrafluoroetileno (TFE); pertence à família dos ionômeros, ou seja, é constituído de íon que forma uma matriz de baixa constante dielétrica causando agregação de cargas sob a forma de aglomerados, tendo sua existência experimental e teórica enunciadas por FC Wilson em 1968 e Eisenberg em 1970. O debate acerca da morfologia deste material se deve ao fato do ionômero apresentar estrutura química única aleatória, com capacidade de organizar uma formação de complexo de regiões iônicas e cristalinas com distribuição significativa em amplas escalas de comprimento (RODRIGUEZ et.al., 2009)

O Nafion® é um polímero que apresenta domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, onde a cadeia principal, cuja composição é semelhante ao politetrafluorcarbono (PTFE ou Teflon®), e é responsável pela estabilidade morfológica do polímero (figura 16). À cadeia principal, encontram-se ligadas cadeias laterais de perfluoro-eter terminadas com um grupo ácido sulfônico, os quais são responsáveis pela característica hidrofílica e, conseqüentemente, pela hidratação e mobilidade protônica na membrana (PERLES, 2008); devido à elasticidade do polímero e a grande quantidade de grupos funcionais de ácido, esses materiais apresentam a capacidade de “intumescer” ou “inchar”, mantendo-se a cerca de 20 moléculas de água por grupo de ácido sulfônico (à pressão atmosférica) (NAVARRO et.al., 2014).

Muitas pesquisas acerca de substâncias que apresentem eletrólitos de transporte de células combustíveis vem sendo desenvolvidas; assim, a elaboração de polieletrólitos para uso em células combustíveis é apontado como alternativa para uso na combustão interna de veículos; dentre esses polietrólitos, o náfion apresenta destaque (CACCIOLA et.al., 2001). Outra aplicação do polímero que vem despertando o interesse é a elaboração de filmes para recobrimento de superfícies eletródicas auxiliando na imobilização de biomoléculas, podendo também servir como uma barreira seletiva para interferentes já que o filme é aniônico. As características de excelente estabilidade e biocompatibilidade tem papel principal no processo. Na tentativa de aprimorar a condutividade do náfion em biossensores, vários estudos relatam a associação com nanomateriais como nanopartículas, nanotubos de carbono (LIU et.al., 2010; CANBAY & ALKYILMAZ, 2014; BABAEI & TAHERI, 2013).

Figura 16- Unidade monomérica de náfion.

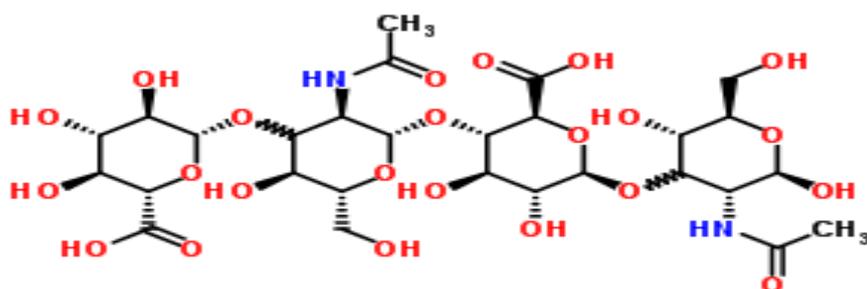


Fonte: www.sigmaaldrich.com Acesso em 23.07.15 as 15:30.

7.2 –ÁCIDO HIALURÔNICO:

Em termos de estrutura química, o ácido hialurônico (AH), classifica-se como um mucopolissacarídeo de alto peso molecular, do grupo das glicosaminoglicanas, e se constitui por repetições de unidades de D- ácido glicurônico e N-acetilglicosamina, intercalados por ligações glicosídicas β (1,4) e β (1,3). Pode ser encontrado tanto nos vertebrados como em algumas bactérias; em seres humanos, está amplamente distribuído nos tecidos conjuntivo, epitelial e neural, com função estrutural e hidratante. É um dos principais componentes da matriz extracelular, contribuindo para a proliferação e a migração celular (SCHANTÉ, 2011; MOULTON et.al. 2007). A figura 17 mostra a organização da molécula.

Figura 17- Estrutura química do ácido hialurônico.



Fonte: www.naturale.med.br . Acesso em 16.10.2015 as 00:23.

Em condições fisiológicas apresenta-se carregado negativamente e na forma de sal de sódio (hialuronato), altamente hidrofílico e rodeado por uma esfera de moléculas de água, ligadas por pontes de hidrogênio; isso destaca suas propriedades viscoeláticas, o que leva à formação de redes e consequentemente o aumento da concentração na solução, forma os hidrogéis (CABRAL, 2014). No entanto, essas soluções apresentam uma semi-vida curta, exigindo uma estabilização por modificação química, visando uma maior durabilidade e robustez mecânica. Hidrogéis de AH podem ser obtidos através do uso de agentes de reticulação altamente reativos como divinilsulfona, glutaraldeído entre outros (HUERTA-ANGELES et.al., 2012).

Dentre as várias aplicabilidades, a estética e a médica tem se destacado. Por ser uma substância livre de imunogenicidade, AH se mostra atuando como biomaterial em cirurgias

oftamológicas, sendo inclusive um dos primeiros relatos de aplicação médica (substituição do humor vítreo), (HASCALL & LAURENT, 1997), para separação de tecidos conectivos traumatizados por cirurgias, lesões, evitando adesões e formação excessiva de cicatrizes, substituição do fluido sinovial em artrites dolorosas, auxílio no processo de cura, com função específica de proteção de regiões lesionadas, entre outras (BICUDO, 2011). A literatura ainda apresenta acervo limitado quanto ao uso do ácido hialurônico na construção de imunossensores.

9. ARTIGO 1:

**HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIBODIES DETECTION USING A DISPOSABLE
NANOHYBRID GOLD ELECTRODE**

AUTORES: Soares, E.C.L.¹; Cabral, D.G.A.¹; Menezes, C.E.L; Trindade, E.K; Dutra, R.A.F¹;

**HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIBODIES DETECTION USING A DISPOSABLE
NANOHYBRID GOLD ELECTRODE**

^aSoares, E.C.L.; ^aCabral, D.G.A.; ^aLeal, C.E; Gobbi, A.L.^b; ^aDutra, R.F*;

*^aBiomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes
Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.*

*^bLNNano - Brazilian Nanotechnology National Laboratory, Microfabrication Laboratory –
CNPEM, Campinas, São Paulo, Brazil.*

*Corresponding author:

Prof. Rosa Fireman Dutra

E-mail address: rosa.dutra@ufpe.br

Phone/Fax.: +55 81 21267325

Abstract

An electrochemical immunosensor developed for detection of antibodies to hepatitis B core antigens (Anti-HBc) is described. Anti-HBc is the earliest serological marker from hepatitis B virus (HBV) infection, remaining all life during the chronic infection. The detection of anti-HBc is important for screening of blood banks. A nanohybrid surface assembled by nafion and carbon nanotube onto a disposable tip sensor was used as sensing platform to detect the Anti-HBc. All the steps of electrode surface modification were characterized by Scanning Electronic Microscopy and extensively evaluated by electrochemical techniques. The electrode response was measured by direct anti-HBc antigen interactions through the square wave voltammetry technique, using the $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ as redox probe. The immunosensor presented a linear curve from 0.5 to 3.0 ng/ml and detection limit was found at 0.15 ng/mL of anti-HBc. The immunosensor shows as potential for analytical test to prevent the risk of contamination of donor blood. This immunosensor has advantage of dispensing label or chemical mediators for analytical responses.

Keywords: Hepatitis B; Immunosensor; Carbon Nanotubes; Nafion; Nanosensor.

1. Introduction

Hepatitis B is a major cause of liver disease and the top ten causes of death worldwide [1]. The disease can occur due to autoimmune or metabolic disorders, drugs, genetic factors, alcohol abuse, toxic substances and microorganisms [2]. Due to the possibility of chronification, complications such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma has been responsible for a high morbidity and mortality rates [3]. Hepatitis B virus (HBV) belongs to the Hepadnaviridae family, consisting of a double-stranded DNA, very resistant to acid pH, moderate heat and low temperatures and surviving in environment for at least one week [4, 5]. The detection of DNA is clinically important because they allow estimation of viral replication and responsiveness to therapy [6]. Although several assays have been developed for the detection of DNA, including PCR and hybridization techniques, they present limited sensitivity and involve complex procedures. Thus, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is still the most commonly used to HBV detection [7]. However, ELISA tests have several inconvenients, such as require skilled personal, involve sophisticated equipment and are time consuming. On the last few decades, biosensor researches have gained crescent prominence attributable to the surpassing of electronic devices for all the mentioned requirements, being more practical, lower cost, easier miniaturization, user friendly and offering quantitative responses, contrary to lateral flow tests [8].

Recently, disposable screen-printed electrodes constructed of carbon inks have achieved high performance, low background current and improved electron transfer kinetic, due to the incorporation of modifying agents with conductive capacity such as carbon nanotubes [9]. In fabrication process, conductor inks are printed onto a substrate and cured. Although this techniques present an easy portability and miniaturization, fabricating electrodes with varied sizes and formats [10], possesses disadvantage of needing operators to

deposit the ink onto the substrate and the ink components are usually toxic. Electrodes based on gold films by etching made through photolithographic processes have shown to be more practical, with the possibility of technology adjustment to various types of substrates, in addition to rapid and large scale production.

Several researches about new immunosensors for diagnosis of hepatitis B have been reported in the literature. [11] Nourani et al. (2013) and [12] Lee et al. (2009) developed electrochemical and surface acoustic wave immunosensors for detection of antibodies and antigens of surface (HBsAg and anti-HBs, respectively). Herein, the hepatitis B core antibody (anti-HBc) detection by core antigen (HBcAg) immobilization because it is the first antibody to be detected in the serum and sometimes the single marker to be found during the infection course, thus is an ideal marker for control and prevention of contamination of disease. Faced with the high morbidity and mortality of the disease, every effort has been made by health services to prevent and control its advance. In this sense, hemotherapy services look for investigative testings of serological markers that detect HBV positive in the blood bag. In some countries, these tests are only performed after donation, which result in a discard unnecessary of blood bags [13]. Thus, fast, effective and easy to handle diagnostic methods, like immunosensors should promote significant advances in control and prevention of hepatitis B due to its lower cost, efficiency and practical use, being a point-of-care testing.

The immunosensor development usually starts by modifying the sensor platform through the development of films. Currently, polymeric films have being built from monomers or polymers previously assembled associated with nanomaterials such as carbon nanotubes [14], incorporated to ionic liquids [15], associated to quantum dots (QD) in a surface covered with silica nanospheres [16] and others. Among the different strategies, the ones that make use of the association between hybrid polymers and carbon nanotubes have shown great potential. The combination of polymers with CNT is beneficial, since the CNT may improve the electrical conductivity and the mechanical strength of the polymer-CNT

hybrids due to their unique properties and their geometry, which provides a three-dimensional nanostructure on a large electroactive area [17]. Polymers can be formed by electropolymerization on electrodes previously modified with CNT, or they may be co-immobilized on the electrode with CNT during electropolymerization, from a dispersion of CNT and water-soluble monomer or a CNT electropolymerization previously synthesized [18] (Le Goff, et al., 2011). Electrostatic interactions can occur as a result of functionalized nanotubes, changing the modified surface charge to negative in the case of functionalization with carboxylic groups (-COOH) or positive, with amino groups (-NH₂). Interestingly, a synergistic effect resulting from the combination of carbon nanotubes, and conducting polymers has been evidenced in electrochemical biosensors [19].

Nafion is a polyelectrolyte with a tetrafluoroethylene base and presents ions covalently attached to the polymer main chain, promoting mobility or ion exchange with the environment. This ionic conduction is possible due to the movement of ions when the polymer is immersed in solvents that allow it [20]. The literature has reported the use of this polymer as supporting agent in the preparation of conjugated polymers and associated with CNT, in addition to the possible occurrence of hydrophobic interactions between Nafion and carbon nanotubes, which have promoted the formation of tough films with great potential for efficient immobilization of biomolecules in electrodic surfaces modified by these films [19, 21, 22].

Electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV) are potential tools to evaluate not only the sensor surface, but also the immobilization of biomolecules. Recently, label-free techniques for construction of immunosensors have showed as the use of antibody conjugates, due to the covalent immobilization of biomolecules and improved analyte detection by the use of conjugated polymers and CNT interactions [23]. Thus, the association between Nafion and carbon nanotubes shows promise for electrochemical immunosensor developments.

2. Material and methods

2.1. Reagents

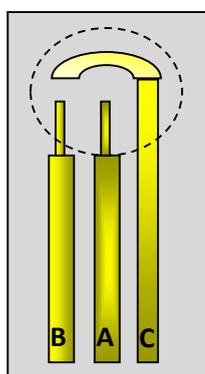
Nafion® 117 solution, bovine serum albumin (BSA) and potassium ferricyanide were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA). Ethanol and potassium chloride acquired from F. Maia (Cotia, BRA); trihydrate potassium ferrocyanide from Vetec (Duque de Caxias, BRA). Hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and monoclonal Hepatitis B virus core antibodies (anti-HBc) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Carboxylated multiple-walled carbon nanotubes (COOH-MWCNT-) 95% purity were obtained from Dropsens® (Oviedo, SPA). The ultra-pure water used in prepare of all the solutions was acquired from a Milli-Q station (MilliQ, USA) with conductivity below $18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.2 - Fabricating of the gold tip sensor

The tip sensor consisting of three electrodes was fabricated in a clean room (class 10.000) using an acetate sheet as substrate. The gold film was evaporated onto the substrate previously cleaned and recovered by chrome. Firstly, the tip sensor was immersed in a solution containing the photoresist resin. Afterwards, the tip sensor was exposed to the UV radiation to polymerase the resin according to negative mask. The areas protected by non-radiation, i.e. with not polymerized resin, were cleaned with acetone. Then, the tip was submitted to a photolithography by gold etching in order to obtain three strips of gold film, i.e. the working, counter and reference electrodes. The rectangular area of working electrode

was approximately 1.5 mm². The working circular area was delimited using a perforated adhesive tape resistant to chemical (electroplating and anodizing vinyl tape 470 supplied to 3M Co., USA) (Figure 1).

Figure 1. Schematic representation of the gold tip sensor with three electrodes: A- working, B- reference, C- counter electrode.



2.3 – Assembling the HBcAg nano hybrid gold electrode

Previously, 1mg of MWNTC-COOH was dispersed in 0.05% nafion ethanolic solution by submitting in an ultrasound bath (Eco-Sonics® - ultronique, Idaiatuba-SP, BRA) for 2h at room temperature (25°C) to obtain a homogeneous and black solution. The MWNTC-COOH dispersion (2µL) was pipetted on the electrode surface and the film was obtained by drop casting after 3 layers.

To immobilize the antigen on the nanostructured nafion film, an aliquot (2 µL) of the HBcAg solution (10 µg mL⁻¹) was pipetted onto the electrode surface and incubated for 1 h at

room temperature. Non-specific bindings were blocked by incubating the electrode surface in a solution of 1 mg mL^{-1} BSA prepared in PBS (pH 7.4, 10 mmol L^{-1}) for 30 min.

2.4 - The analytical responses and characterization methods

The analytical responses of the immunosensor were obtained by incubating anti-HBc samples ($2\mu\text{L}$) on the working electrode, in different concentrations for 30 min at room temperature (25°C). In order to avoid the evaporation of solvent, the incubation of samples were submitted in a moist chamber.

All the electrochemical measurements were performed by pipetting $40\ \mu\text{L}$ redox probe solution (5 mmol L^{-1} of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in 0.1 mmol L^{-1} KCl) onto the active area delimited of the gold tip sensor. This was electrical connected to the potentiostat/galvanostat Metrohm-Autolab®4.9 (Utrecht, Netherlands) coupled to a computer with the GPES 4.9 program. The analytical responses were performed by square wave voltammetry with 0 to -3V potential window, amplitude of 60mV and frequency of 10Hz . Electrochemical characterization of stepwise modifications on the electrode surface was carried out by cyclic voltammetry at 0 to 5V potential range at 100 mV s^{-1} .

Scanning electronmicroscopy (SEM) images were obtained in a JSM 5900 (JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 20 kV and a working distance of $0.5\ \mu\text{m}$.

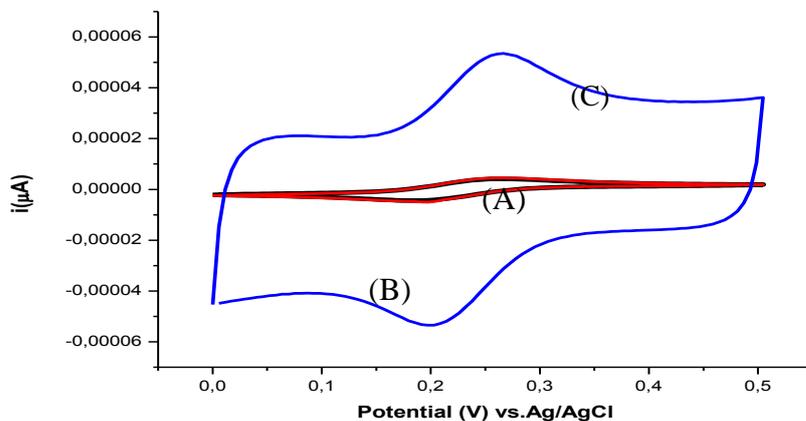
The atomic force microscopy (AFM) technique was used for morphological and topographic characterization of the nanohybrid gold electrode. The micrographs were obtained using a WITec Alpha 300S AFM microscope (WITec Instruments, Ulm, Germany) operating in contact mode with a silicon tip at 0.2 N/m constant force.

3. Results and discussion

3.1. Obtaining the HBcAg nanohybrid gold electrode

The choice of dispersion agent of COOH-MWCNT is a crucial step to obtain a regular and homogeneous nanostructured film on electrode surfaces [24]. Herein, nafion has been cited as a dispersing agent that prevents coalescence and aggregation of COOH-MWCNTs due to its anionic nature. It induces a repulsive electrostatic force against the negatively charged carboxylated nanotubes leading to a uniform and reproducible film obtaining. In Figure 2 is shown the cyclic voltammetric curve resulting from drop casting of the three layers compared with to the bare electrode. The optimal number of layers was obtained was established by observing the steady-state achieved by redox peaks of cyclic voltammetry (Supplementary S1 figure).

Figure 2 - CV of the gold tip sensor: in (A) Bare (B) with a layer ethanolic film Nafion (C) Drop casting of three layers with COOH-MWCNT nafion. All CV obtained at 100mV/s in presence of 5 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ in 0.1 mmol L⁻¹ KCl. In:



The increase of electroactive area of the COOH-MWCNT nafion film modified electrode was calculated according to the Randles–Sevcik Equation (Bard & Faulkner, 2001):

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

where, I_p is the peak current value, A represents the electroactive area of the electrode (cm^2), D is the diffusion coefficient of the probe molecule in solution ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), n is the number of electrons involved in the redox reaction, v is the potential scan rate (V s^{-1}) and C is the concentration of the probe molecule in solution. Under this condition (Equation 1), an increase of the electroactive area approximately 10.5 times more than to bare electrode was observed, indicating an electrocatalytic profile. This increase is due to the presence of carbon nanotubes within the nanocomposite that induce increase on the capacitive and faradic currents. Whereas the nafion film (drop casting of three layers) is merely formed on electrode

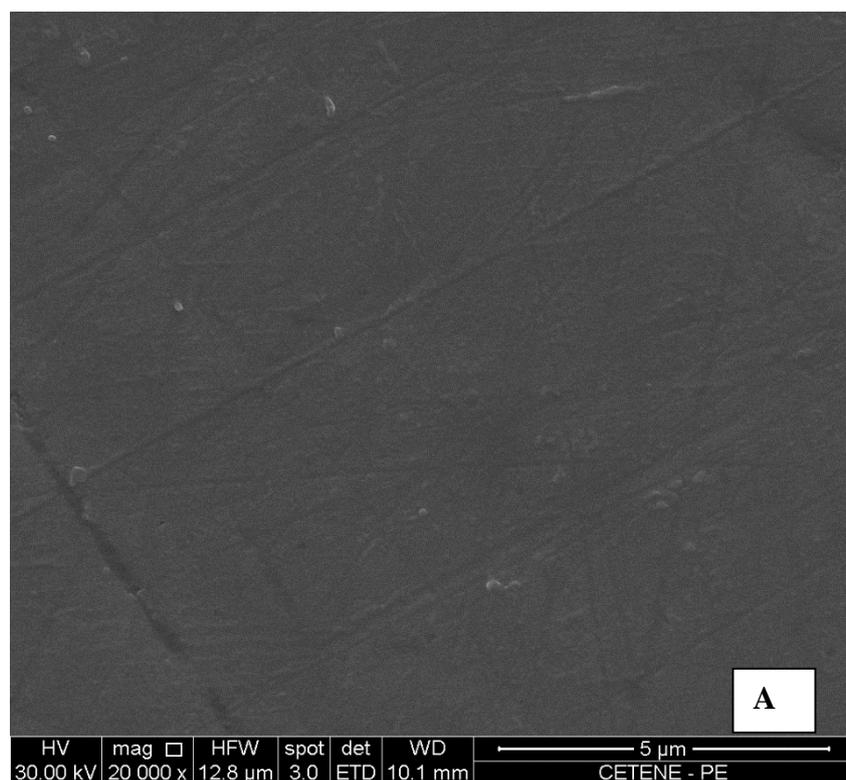
surface, the CV profile of bare and nafion film are practically similar. On the other hand, if carbon nanotubes are applied straightly pipetted on the electrode surface, they are easily lixiviated during several steps of immunoassay due to their weak binding to electrode surface [8].

3.2. Morphological characterization of the HBcAg nanohybrid gold electrode

The process of sensing surface modification was accompanied by SEM (Fig. 3). Micrographs (a) and (b) show the bare and the COOH-MWCNT nafion film modified electrode, respectively. It is clearly observed the COOH-MWCNTs entangled within the nanocomposite that can be also stoutly confirmed at expanded view (figure c). In this micrograph, the COOHMCWCNTs are distributed as cross-linked fibrils-like structures at this time enclosed by the nafion polymer that has a lower brightness.

It has been shown that the thickness of a polymer composite with carbon nanotubes dramatically influences the film conductivity. Herein, the drop casting techniques adopted resulted in a film in nanoscale patterning with advantage to be a practical method. The rugosity due to nanocomposite deposition on the gold electrode resulted in an increase of approximately 80 – 100nm. In some regions, the increase was higher than 100nm as observed at micrographs viewed by AFM (Figure 4). The choice of number of layers adopted by drop casting was also optimized taking in account the thickness of film, considering their conductivity as above mentioned (Supplementary S1 Figure).

Figure 3 - Scanning Electron Microscopy (SEM) of the gold printed electrode surface characterization steps. **A**: pre-treated surface (20,000x); **B**: modification with Nafion at 0.05% (v/v - 20,000x); **insert**: modification with the Nafion+MWNTC-COOH film.



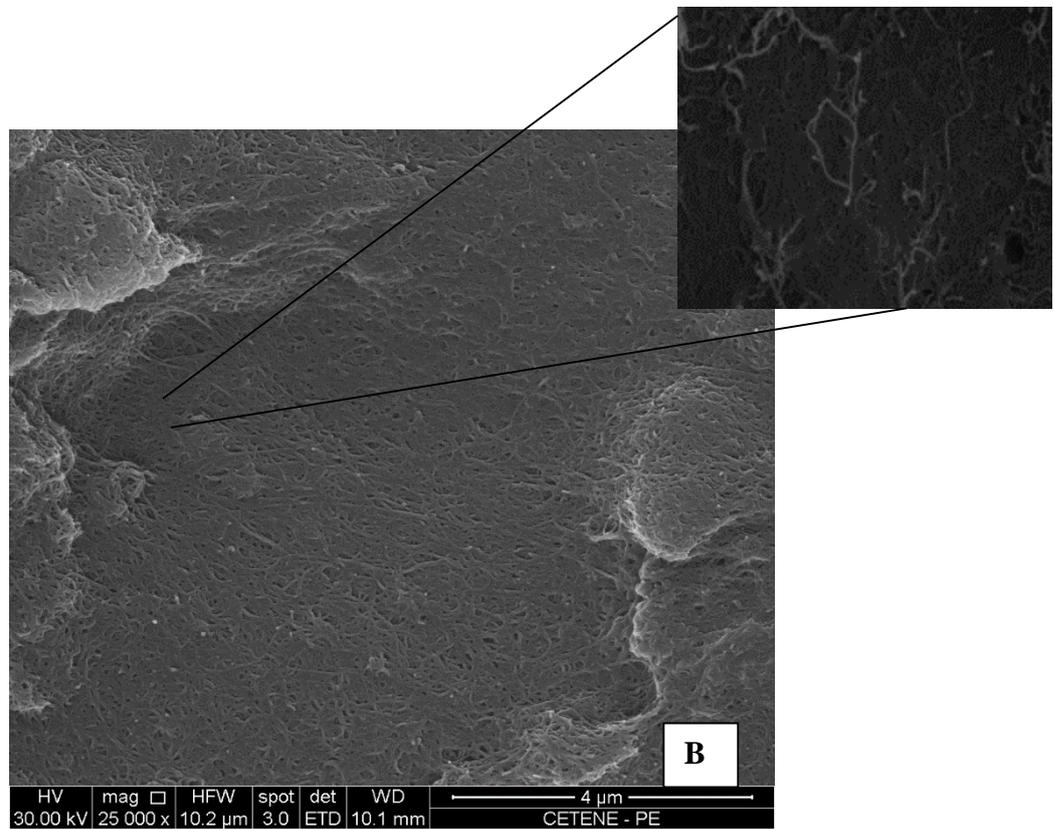
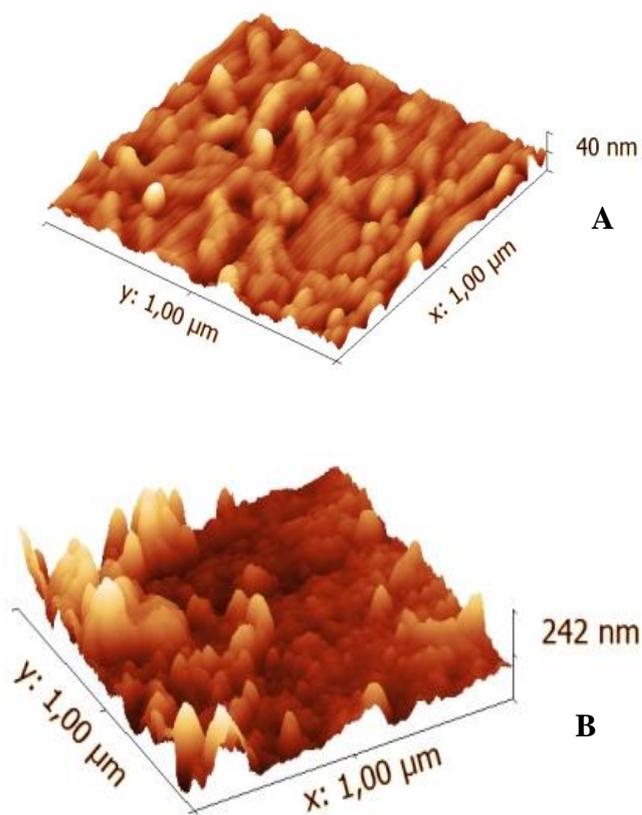


Figure 4- AFM micrographs. In **A**: Bare electrode; **B**: COOH-MWCNT nafion film electrode.

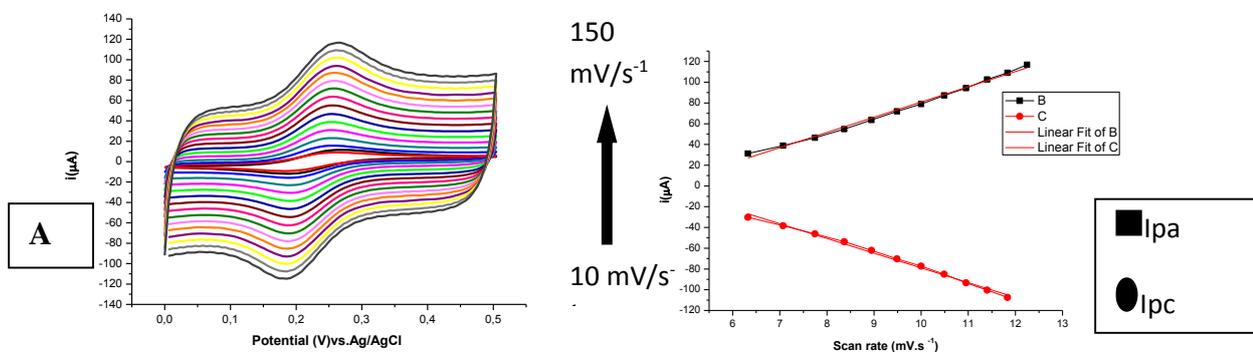


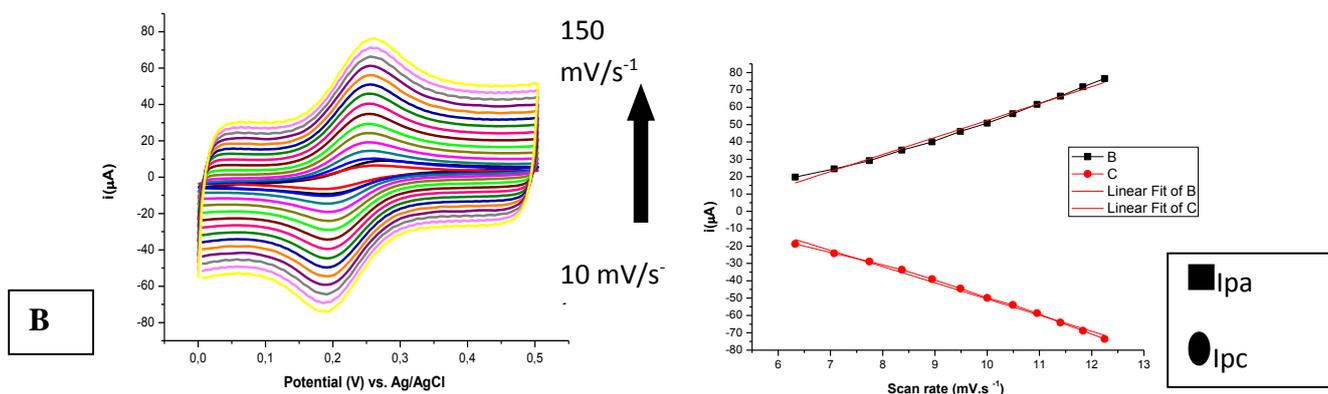
3.3- Stability of the COOH-MWCNT nafion film

Some information about the electrochemical mechanisms that occur at the electrode/matrix interface are obtained by studying the relationship between the cathodic and anodic current peak derived from the scan rate of potential [25]. Herein, cyclic voltammograms with different scan rates varying from 10 to 150mVs⁻¹ were performed to evaluate the stability of MWNTC-COOH nafion film on the gold electrode (Figure 5). The

currents of the anodic and cathodic peak increased linearly with the square root of the scan rate showing a $r = 0.997$, $n=12$, $p \ll 0.01$ indicating that the process was controlled by diffusion. There was a partial proportionality between the cathodic and anodic peak currents with the square root of the scan rate, showing that the charge transfer occurred quasi reversibly, probably due to the anionic nature of the nafion [26]. The long-term stability of the MWNTC-COOH nafion was also evaluated using the same CV procedure before described, maintaining the electrode immersed in distilled water. After four days, the anodic and cathodic current resulted in coefficient of variation of approximately 1.0% for both peaks as compared to control (after ready), demonstrating that the film was stable and reproducible.

Figure 5: CV of the MWNTC-COOH nafion gold electrode with its respective current peak. **A:** electrode surface modified with the film. Reading held on the experiment; **B:** electrode surface modified with the film with read after four days in distilled water. CVs were performed in 10mL of a 5 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ solution.





3.4 - Electrochemical characterization of the immunosensor

The use of polymers associated with the functionalized carbon nanotubes is well reported. Sensors that result from this association have better analytical performance when compared to the ones that are produced only in the presence of the polymer [27]. The functionalization of the nanomaterial facilitates interface with the polymer and the adhesion of the biomolecule of interest. Concerning the immunosensors, the molecule to be immobilized is the antigen (Ag) in search for antibodies (Ab), or vice versa. Quantitative analyzes of the Nafion/NTC-COOH film deposition, HBcAg immobilization and anti-HBc detection were evaluated by cyclic and square wave voltammetry. Figure 4 shows the stepwise modifications of gold electrode. There is an increase of redox peaks with the deposition of the film on the electrode surface in relation to the bare electrode, which is explained by the presence of the carbon nanotubes. After immobilization of HBcAg, there is further increase in the redox peaks, contrary to several antibodies immunosensor behaviors [14, 8] (Gomes et al., 2013; Dias et al., 2014). That was attributed to the strong anionic charge of antigen derived from process of purifying by affinity chromatography. Metal ion has been

widely used and recognized by making histidine residues available on the molecule surface. The recovering the reactive free site with BSA is confirmed by a decreasing of redox peaks. [28].

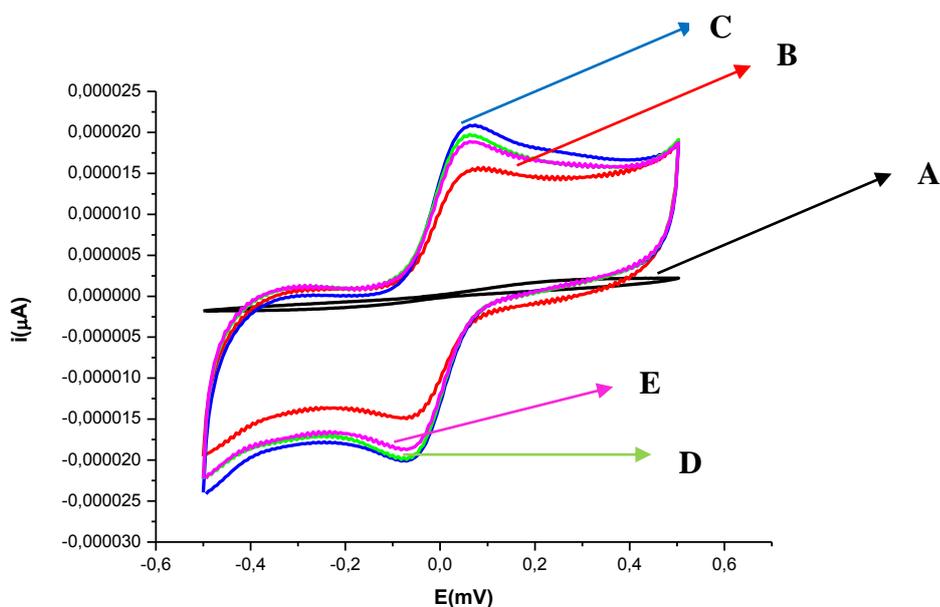
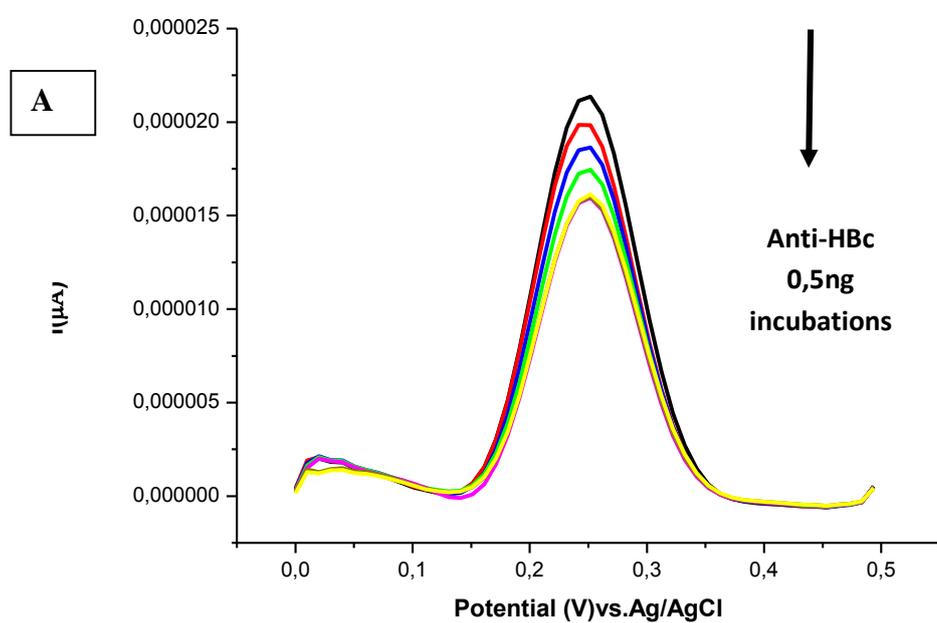


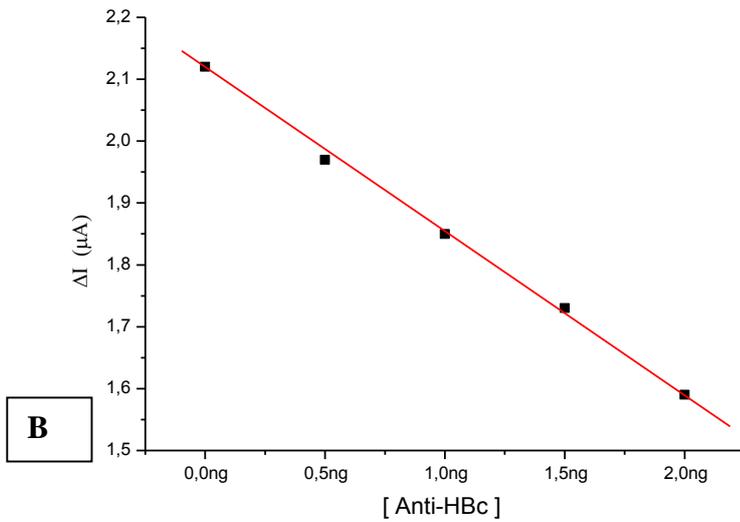
Figure 6 - Cyclic voltammograms showing each step of the immunosensor characterization process in printed gold electrode in redox probe at $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; **(A)**: the electrode unmodified, **(B)**: Nafion Modified / MWNTC-COOH, **(C)**: Immobilization of HbC-Ag **(D)**: BSA solution, **(E)**: Anti-HBc (1ng / ml) .

3.5- *Analytical response of the immunosensor*

After optimization of experimental conditions, analytical curves were obtained. The electrodes were consecutively incubated with 0.5 ng/mL anti-HBc for 30 minutes and then subjected to square wave voltammetry (SWV) in solution of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) prepared in $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ of KCl. The stepwise decrease of the of the SWV cathodic peaks resulted in an analytical curve range varying from 0.5 to 2.0 ng/mL and a limit of detection (LOD) found at 0.15 ng mL^{-1} anti-HBc. The available diagnostic kits for detecting hepatitis B detection from ($>2\text{ng/mL}$), showing that this test is more sensitive [29]. As compared to previously registered immunosensor for anti-HBc [13], the system has advantage to be more easy construction and lower LOD and lower cost allowing to be disposable after use. It is possible to develop a portable immunosensor for point-of-care screening applied to hemotherapeutic services.

Figure 7. Square wave voltammograms showing the anti-HBc in successive incubations at 0.5ng/mL (a) and analytical curve with linear fit, with range. from 0.0 to ng/ml. All the measurements were performed in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) prepared in $0,1\text{ mmol L}^{-1}$ of KCl.





4. Conclusions

A simple and disposable tip sensor was developed to detect anti-HBc antibodies, the more remain marker due to prior contact with the virus at any time in life. Thus, the proposed label-free immunosensor shows as potential tool for use in blood banks with a screening of donors. The detection limit and linear range achieved are comparable to conventional used methods. Drop coating method of COOH-MWCNT nafion film deposition with controlled layers on the gold tip sensor show as potential to scale-up to the HBcAg immunosensor.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Agency and the Pernambuco State Foundation (FACEPE) in Brazil. E.C.L Soares thanks the Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES) for her scholarship. The assistance of the Northeast Center for Strategic Technologies (Recife, Brazil) is also acknowledged.

References

[1] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Hepatitis B. Disponível em: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdcsrlyo2002_2.pdf.

[2] Monjezi, R.; Tan,S.W.; Tey,B.T.; Sieo,C.C.; Tan,W.S. 2013. Detecction of hepatitis B vírus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. **Journal of Virological Methods** 187 : 121-126.

[3] Lyra, A.C; Cavalcante, L.N.; Lyra, L.G.C. 2015 . Hepatite B crônica. **Revista Brasileira de Medicina**. 1-7.

[4] Brasil. 2009.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF.

[5] Vaness, D.; Joseph, I.; Marinho, R.; Areias, J.; Carvalho, A.; Macedo,G.; Matos, L.; Rodrigues, B.; Velosa, J.; Aragão, F.; Perelman, J.; Revankar,N. 2012. Custo-utilidade do tenofovir comparado com entecavir no tratamento em primeira linha da hepatite B crónica. **Portuguese Journal of Gastroenterology**. 19(4): 170-182.

[6] Kawaguchi, K., Kaneko, S., Honda, M., Kawai, H. F., Shiota, Y. and Kobayashi, K. (2003) 'Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method', **Journal of Clinical Microbiology**, 41(4), pp. 1701-1704.

[7] Changotra,H; Sehajpal,P.K. 2005. Quantitative detection of serum HBV DNA levels employing a new S gene based cPCR assay. **Archives Virology** 34: 15-21.

[8] Dias, A.C.M.; Gomes-Filho, S.L.R.; Silva, M.M.S.; Dutra, R.A.F. 2013. A sensor tip based on carbono nanotube-ink printed electrode for the dengue vírus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics** 44: 216-221.

[9] Mohamed,G.G.; Ali,T.A.; El-Shahat,M.F.; Al-Sabagh,A.M.; Migahed,M.A.; Khaled, E. 2010. Potentiometric determination of cetylpyridinium chloride using a new type of screen-printed ion selective electrodes. **Analytica Chimica Acta** 673: 79-87.

[10] Gornall, D.D.; Collyer, S.D.; Higson, S.P.J. 2009. Investigations into the use of screen-printed carbon electrodes as templates for electrochemical sensors and sonochemically fabricated microelectrode arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical** 141: 581-591.

[11] Nourani, S.; Ghourchian, H.; Boutorabi, S.M. Magnetic nanoparticle-based immunosensor for electrochemical detection of hepatitis B surface antigen. **Analytical Biochemistry** 441(1); 1-7, 2013.

[12] Lee, H.J.; Namkoong, K; Cho, E.C.; Ko, C.; Park, J.C.; Lee, S.S. Surface acoustic wave immunosensor for real-time detection of hepatitis B surface antibodies in whole blood samples. **Biosensors and Bioelectronics**, 24 (10), 3120-3125, 2009.

[13] Cabral, D.G.A.; Lima, E.C.S.; Moura, P.; Dutra, R.F. A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid-carbon nanotube hybrid film (2016). **Talanta** 148, 209–215.

[14] Gomes, S.L.P.F.; Dias, A.C.M.S.; Silva, M.M.S.; Silva, B.V.M.; Dutra, R.F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. 2013. **Microchemical Journal**, 109, 10-15.

- [15] Franzoi, A.C.; Brondani, D.; Zapp, E.; Moccelini, S.K.; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos 2011. **Química Nova**, 34 (6), 1042-1050.
- [16] Yang, Y.Q.; He, X.W.; Wang, Y.Z.; Li, W.Y.; Zhang, Y.K. Epitope imprinted polymer coating CdTe quantum dots for specific recognition and direct fluorescent quantification of the target protein bovine serum albumin 2014. **Biosensors and Bioelectronics**, 54, 266-272.
- [17] Mylvaganam, K.; Zhang, L.C. 2007. Fabrication and application of polymer composites comprising carbon nanotubes, **Recent Patents Nanotechnology**, 1 59–65.
- [18] Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes 2011. **Analyst**. 136: 1279–1287.
- [19] Barsan, M.M.; Ghica, M.E.; Brett, C.M.A. 2015. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/ carbon nanotube modified electrodes: A review. **Analytica Chimica Acta**, 881; 1-23.
- [20] Riess, I. 2000. Polymeric mixed ionic electronic conductors. **Solid State Ionics**, 136-137; 1119-1130.

[21] Umasankar, Y.; Periasamy, A.P.; Chen, S.M. 2010. Poly(malachite green) at nafion doped multi-walled carbon nanotube composite film for simple aliphatic alcohols sensor. **Talanta**, 80; 1094-1101.

[22] Umasankar, Y.; Periasamy, A.P.; Chen, S.M. 2011. Electrocatalysis and simultaneous determination of catechol and quinol by poly(malachite green) coated multiwalled carbon nanotube film. **Analytical Biochemistry**, 411; 71-79.

[23] Serafín, V.; Aguí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. Determination of prolactin hormone in serum and urine using anelectrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionicacid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes 2014. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 195; 494-499.

[24] Gavalas VG, Law SA, Christopher Ball J, Andrews R and Bachas LG, Carbon nanotube aqueous sol-gel composites: enzyme-friendly platforms for the development of stable biosensors 2004. **Anal Biochemical** 329:247–52.

[25] Huang,K.J.; Niu,W.Z.; Xie,W.; Wang, A. 2010. A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-Au/ multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified glassy carbon electrode. **Analytical Chimica Acta** 659: 102-108.

[26] Liu, Y-L; Su, Y-H.; Chang, C-M.; Wang, S-M.; Lai, J-Y. Preparation and applications of Nafion-functionalized multiwalled carbon nanotubes for proton exchange membrane fuel cells 2010. **Journal Material Chemistry**, 20, 4409-4416.

[27] Yáñez-Sedeño, P.; Riu, J.; Pingarrón, J. M.; Rius, F. X.. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes 2010. **Trends in Analytical Chemistry**, 29: 9, 938-953.

[28] Bresolin, I.T.L.; Miranda, E.A.; Bueno,S.M.A, 2009. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, 32, 5,1288-1296.

[29] http://healthbiotech.en.alibaba.com/product/577915716-200580988/one_step_HbcAb_ANTI_Hbc_Hepatitis_B_rapid_medical_diagnostic_test_kits.html. Acessado em: 16/05/2014 às 15:35.

10. ARTIGO 2

Talanta 148 (2016) 209–215



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid–carbon nanotube hybrid film



Diego G.A. Cabral^a, Erika C.S. Lima^a, Patrícia Moura^b, Rosa F. Dutra^{a,*}

^a Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Pathology Department, Pernambuco State University, Recife, Pernambuco, Brazil



A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid–carbon nanotube hybrid film



Diego G.A. Cabral^a, Erika C.S. Lima^a, Patrícia Moura^b, Rosa F. Dutra^{a,n}

^a Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Pathology Department, Pernambuco State University, Recife, Pernambuco, Brazil

article info

Article history:

Received 16 July 2015

Received in revised form

25 October 2015

Accepted 27 October 2015

Available online 28 October 2015

Keywords:

Hepatitis B

Immunosensor

Carbon nanotubes

Hyaluronic acid

Nanosensor

abstract

An electrochemical immunosensor developed for detection of antibodies to hepatitis B core protein (anti-HBc) is described. Anti-HBc is the earliest serological marker from hepatitis B virus (HBV) infection, remaining all life after contact with virus, being considered the most important marker for uses in screening of blood bank. A nanohybrid surface assembled onto a glassy carbon electrode consisting of amino carbon nanotubes recovered by hyaluronic acid was used as sensing platform to detect the anti-HBc. All the steps of electrode surface modification were characterized by Scanning Electronic Microscopy and extensively evaluated by electrochemical techniques. The electrode response was measured by direct anti-HBc antigen interactions by square wave voltammetry, dispensing uses of label or chemical mediators. Under optimal conditions, the anodic peak current which was proportional to the anti-HBs concentration. The immunosensor response was linear toward anti-HBc in concentrations up to 6 ng mL^{-1} , with a detection limit of 0.03 ng mL^{-1} . The linear range achieved was according to clinical level, indicating the immunosensor as promising tool for use as a criterion for blood bag disposal. The enhancement of the hyaluronic acid by carbon nanotube promoted an increase of charge electron transfer, besides a stable platform for HBc.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection is the major global health problem and the tenth leading cause of death worldwide [1]. HBV may lead to chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2]. It is reported that about 350 million people are chronic hepatitis B carriers [3]. The virus is transmitted through contact with the blood or other body fluids of an infected person. Immunoglobulin antibody to hepatitis B core (anti-HBc) is one of the earliest serological markers during hepatitis B virus infection and remains for all the life after infection. The seropositivity of anti-HBc indicates previous or ongoing infection with HBV in an undefined time frame [4]. Anti-HBc can even be present in the absence of both hepatitis B surface antibody (anti-HBs) and hepatitis B surface antigen (HBsAg). Even if anti-HBs does not appear, the anti-HBc can be detected during convalescent period after acute hepatitis B infection [5]. Moreover, this marker is also associated with non-response to the hepatitis C antiviral therapy, and testing for it may be recommended prior to starting therapy [6]. Therefore,

anti-HBc testing is very valuable and has become mandatory in blood donor centers worldwide to reduce post-transfusion transmission of viral hepatitis [7]. Anti-HBc screening is particularly essential in the hepatitis B endemic countries, where the anti-HBc is the most prevalent marker among the healthy blood donors and negative for all other standard markers of hepatitis B, which represent a great risk for hepatitis B by transfusion. In this sense, there is a recommendation that blood donations must be verified against anti-HBc to avoid transmission to recipients [8]. Nowadays, techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and electrochemiluminescence immunoassay are the most employed for HBV diagnostic. However are time consuming and require skilled personnel. Overcoming these limitations, rapid diagnostic tests (RDT) based on immunochromatography have been developed [2]. Even if the RDTs can provide opportunities for point-of-care, they have limitations regarding detectability, once their results are limited to a qualitative analyses (yes/no). Consequently, it is necessary to develop an accurate screening tests for anti-HBc that has the characteristics of cost-effectiveness, fast response, portable capability, for a faster trial in blood bank, avoiding the discard of the bag blood and transmission of disease. Immunosensors are analytical devices that combine the specificity of

ⁿ Corresponding author. Fax: +55 81 21267325.
E-mail address: rosa.dutra@ufpe.br (R.F. Dutra).

antigen–antibody to generate an electrical signal meeting all demanded mentioned [9].

On the last few decades, immunosensor developments have been emergent with advanced systems that do not require labels for analytical responses, resulting in faster and reliable measurements by reduction in the number of steps and the error of analyses. The first most commonly approaches of electrochemical transducers were based on reaction of substrate and enzyme conjugated to antigens or antibodies, forming a sandwich immunoassay, to generate amperometric responses [10]. Label-free immunosensors derived from direct electrochemical detections have been just reported more recently due to increase of sensitivity of these methods. Their analytical responses derived from antigen–antibody interactions reduce the electron transfer due to the diffusion barrier increase as resulting of insulating nature of biomolecules [11]. Due to HBV diagnosis is focused on the acute phase of the disease, and not simply in the blood donation, many reported immunosensors addressed to the HBsAg and anti-HBs detection have been described [12,13]. Consequently, this is one of the first immunosensor that aims simply to the anti-HBc detection, since this is the most appropriate and valuable marker to identify people who had contact with the HBV at any time in their lives, being ideal for a blood bank test.

Among the nanomaterials, carbon nanotubes (CNTs) have excited scientists and engineers due to their excellent structural, electrical and mechanical properties. In the electrochemical biosensors, CNTs enhance the electrochemical reactivity of important electroactive species with faster ion-to-electron transfer [14,15]. Moreover, CNTs increase the electroactive area permitting an increase of immobilized biomolecules on the electrode surface [16]. Thus, it is possible to improve the amperometric responses through CNTs on the electrode surface, without any reinforcement of chemical mediators or other compounds which may interfere in the analysis.

Hyaluronic acid (HA) is a common component of extracellular matrix and synovial fluid. This natural polysaccharide is of great interest for medical and cosmetic applications. It is particularly promising for uses in regenerative medicine, drug delivery systems, and tissue engineering. In most HA applications, a gel state has to be used. Unfortunately, while raw HA in aqueous media does increase the viscosity of the solution, it does not form elastic gels [17]. Consequently, extensive research has been devoted to develop chemical modifications of HA and covalent cross-linkers over the last decades [18–20]. It was recently reported that the addition of carbon nanotubes (CNTs) could also lead to the formation of HA gels. The research has indicated a remarkable efficiency of CNTs at inducing the gelation of HA, by considering that CNTs easily phase separated as liquid crystals because of their giant aspect ratio [17]. HA–CNT composites have also been investigated as biofibers or as electrode materials for bioelectrochemical applications. The new HA–CNT biogels have already demonstrated promising properties and biofunctionalities. They are biocompatible, electrically conductive, and can serve as scaffolds with electrically stimulated delivery of bioactive molecules such as proteins. Herein, an experimental application of HA–CNT film to covalent bind proteins is reported. The aim is to develop an electrochemical immunosensor to detect antibodies to HbcAg. The analysis time is reduced due to the non-requirement of electroactive species like the peroxidase [21]. The high amount of biomolecules immobilized on the electrode surface associated to conductivity of the HA–CNT film lead to a high electron transfer, allowing a label-free detection by using a redox probe. Recently reports have described label-free immunosensors based on electrochemical transducers that use voltammetric techniques, such as square wave voltammetry (SWV) [22,23]. This technique measures current by generating successive and regular square waves

superimposed on the potential linear sweep or stair steps. Many advantages can be appreciated such as shorter analysis time, non-incubation with antibodies conjugated to the enzyme and the current measurement are not dependent on the Michaelis–Menten kinetic [16].

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Mouse monoclonal antibodies against hepatitis B core antigens (anti-HBc) and HBc antigens were purchased from Abcam (Cambridge, England). Amino multi-walled carbon nanotubes (NH₂-CNTs), 95% pure, were obtained from DropSens (Oviedo, Spain). Hyaluronic acid potassium salt, Potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]), potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]), N-hydroxysuccinimide (NHS), N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), and glycine were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phosphate-buffered saline (PBS) (10 mmol L⁻¹, pH 7.4) used in all experiments was prepared by dissolving 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.24 g KH₂PO₄, and 1.44 g Na₂HPO₄ in 1000 mL of deionized Milli-Q water (from Millipore, units (Bedford, MA, USA). All chemicals were analytical grade.

2.2. Apparatus

Electrochemical measurements were performed using an AUTOLAB potentiostat from Ivium Technologies (Eindhoven, Netherlands) that was interfaced to a computer system and controlled by GPES software. All electrochemical measurements were carried out using a conventional three-electrode system, comprising of a glass carbon electrode (GCE) as working electrode, Ag/AgCl electrode as reference electrode and helical platinum wire as counter electrode. All the potentials presented in this work were determined relative to the Ag/AgCl reference electrode. Electrochemical analyses were carried out using an electrochemical cell (10 mL) and conducted at room temperature (approximately 24 °C).

Scanning Electron Microscopy (SEM) images were obtained in a JSM 5900 (JEOL Instrument, Japan) at an acceleration voltage of 20 kV and a work distance of 0.5 mm.

2.3. Preparation of immunoelectrode to the anti-HBc

Prior to modifications, the GCE was cleaned on a polishing cloth with 1.0, 0.3, 0.05 mm alumina powder, respectively, followed by sonication in water and 95% ethanol for 10 s to remove any residual alumina particles and organic contaminants.

After cleaning, 5 mL of the HA–NH₂-CNT mixer was gently pipetted onto the electrode surface and left to react for 30 min at 40 °C. HA–NH₂-CNT mixer was prepared, firstly by dispersing 7 mg of NH₂-CNT in 1 mL of HA (0.3% w/v) in ultrasonic bath (40 kHz) for 2 h; secondly, by adding 200 mL of EDC/NHC solution (20 mM and 50 mM) [1:1] on NH₂-CNT to activate the carboxylic groups of the mixer.

To immobilize the HBc on the modified GCE, an aliquot (5 mL) of the HBc solution (100 mg mL⁻¹) at pH 8 was dropped onto the electrode surface and incubated for 1 h at room temperature. Non-specific bindings were blocked by incubating the GCE surface in a solution of 50 mmol L⁻¹ glycine, prepared in PBS for 40 min.

2.4. Electrochemical assays and analytical responses

All the steps of HBc immunosensor preparation were characterized by cyclic voltammetry (CV). The CVs were assayed at a

window potential between 0.0 and 0.5 V and at 100 mV s⁻¹.

Analytical responses of antigen–antibody interactions at the interface of the HbC-GCE were monitored by square wave voltammetry (SWV). SWV measurements were recorded between 0.0 and 0.5 V at 50 Hz with a pulse amplitude of 10 mV and a step potential of 0.0025 V. The analytical response to HbC-Ab was obtained taking into account the difference between the peak current (ΔI) of the HbC-GCE with anti-HbC and the blank (i.e. without anti-HbC). The current signals were registered at a fixed potential (0.21 V).

All electrochemical measurements were conducted in 5 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] prepared in 0.1 mol L⁻¹ of KCl.

3. Results and discussion

3.1. Assembling of HA–CNT film on the GCE

Cyclic voltammetry (CV) is an effective and convenient tool to monitor modifications on the electrode surface through the electron transfer rate [24]. The electrochemical behavior of the stepwise fabrication process was studied by immersing the three electrodes in a 5.0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] solution containing 0.1 mol L⁻¹ KCl. K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆], which worked as an electrochemical probe. The voltammograms are shown in Fig. 1. A couple of typical redox peaks appeared at bare GCE (curve 1a). After the surface was covered with HA–CNT film, a significant increase in the electroactive area was observed (curve 1b). The increase of active surface area of the modified GCE can be estimated from the Randles–Sevcik equation [25]:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) AD^{1/2} n^{3/2} \nu^{1/2} C$$

where i_p is the peak current value, A represents the electroactive area of the electrode (cm²), D is the diffusion coefficient of the molecule in solution (cm² s⁻¹), n is the number of electrons involved in the redox reaction, ν is the potential scan rate (V s⁻¹) and C is the concentration of the probe molecule in the solution. An electroactive surface area ratio of approximately 4.5 mm² was achieved between the HA–CNT/GCE and the bare GCE, which corresponds to an increase of approximately 75.7%, meaning an additive effect of the HA on the CNT film obtaining on the electrode surface.

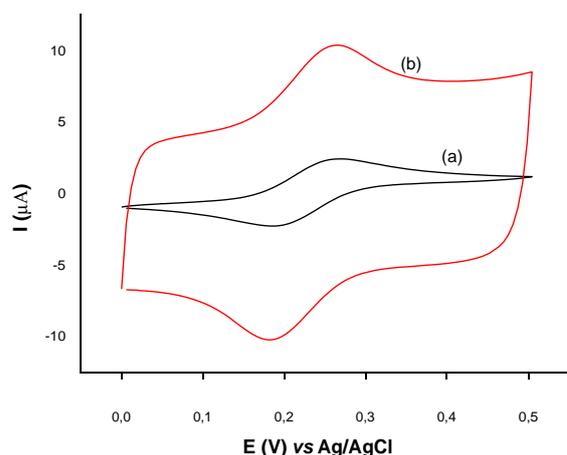


Fig. 1. CVs of the (a) bare GCE, and (b) HA–CNT/GCE. Potential range from 0.0 V to 0.5 V at scan rate of 100 mV/s in aqueous solution consisting of 5 mmol L⁻¹ of K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] in 0.1 mol L⁻¹ of KCl.

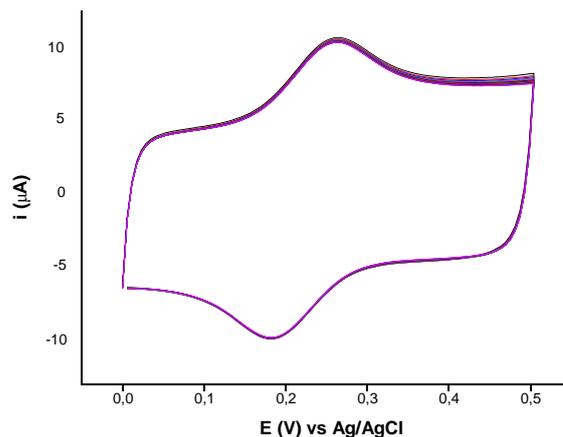


Fig. 2. CVs of the HA–CNT film on the GCE surface. The 20 cyclic voltammograms of K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] in 0.1 mol L⁻¹ of KCl were conducted at 5 mmol L⁻¹.

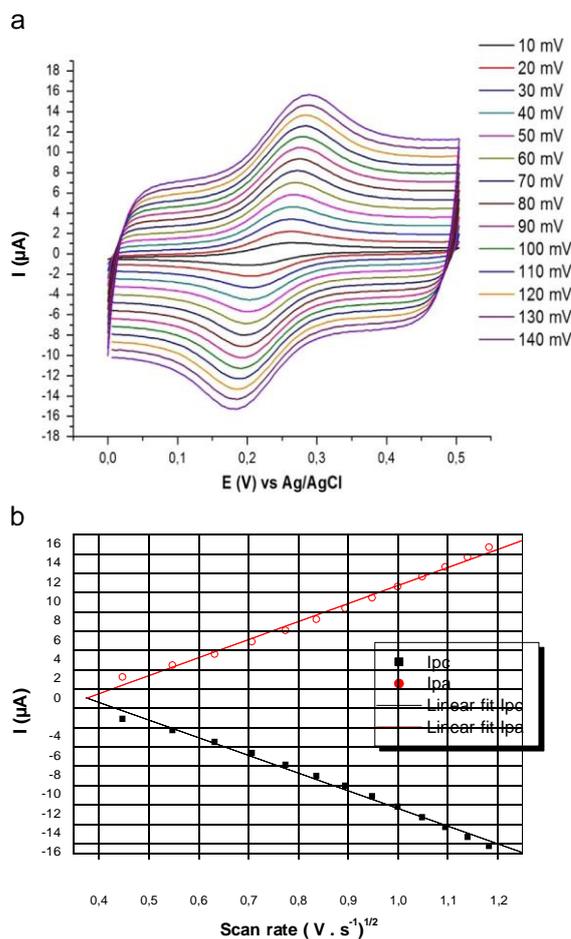


Fig. 3. CV profile of the HA–CNT/GCE in 5 mmol L⁻¹ and 0.1 mol L⁻¹ of KCl at different scan rates, increasing from inner to outer (10–140 V s⁻¹) (b) Plot of square root of scan rate vs current of anodic and cathodic peaks with r² 0.996 and r² 0.998, respectively.

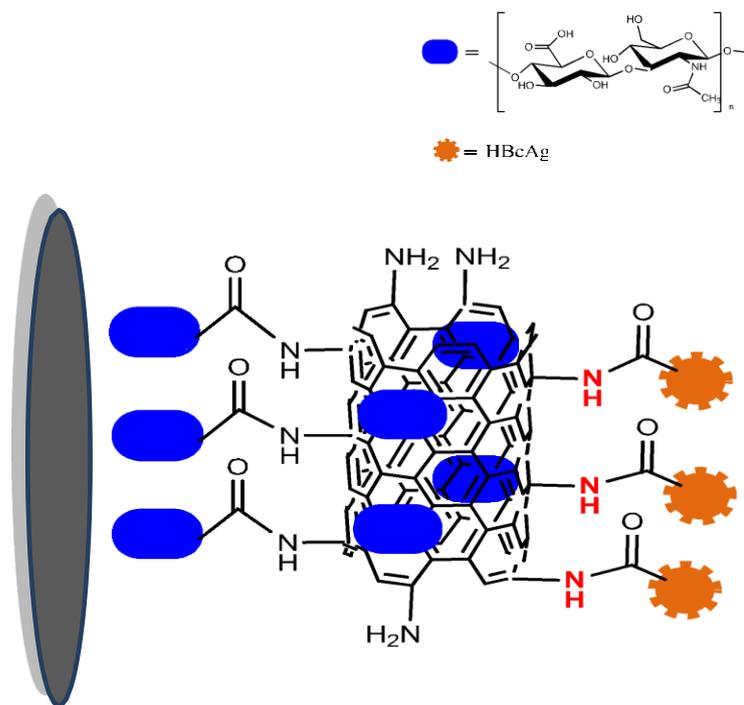


Fig. 4. Schematic representation of the HA-CNT and immobilization of the Hbc antigen.

3.2. Characterization of the HA-CNT film on the GCE

The film stability was evaluated by submitting the Hbc-CGE to 20 voltammetric cycles in a potential window varying from 0.0 to 0.5 V at 100 mV s^{-1} of scan rate. According to Fig. 2, the redox peaks were maintained practically constant during all scanning. The coefficient of variation was approximately 0.85% for the anodic and cathodic peaks, indicating that the HA-CNT film presented a high stability and the electron transfer process was not perturbed by a desorption process of the CNT on the electrode surface. This could be attributed to the HA that stabilized the CNT do not form bundles in response to strong Van der Waals interactions. Instead, the CNTs are stabilized against close contact by short-range repulsive interactions. The latter can arise from steric and electrostatic interactions of the absorbed polyelectrolyte HA. Indeed, HA is a salt that is expected to be highly charged in solution as a consequence of the dissociation of potassium ions [17]. Presumable interactions formed between CNTs and HA allowed a stable immobilization matrix.

The effect of the scan rate was investigated upon the HA-CNT film on the CGE surface. The scan rate was varied from 10 mV s^{-1} to 140 mV s^{-1} (Fig. 3(a)). The voltammograms showed symmetric redox peaks with increase of scan rate. The currents of cathodic and anodic peaks increased linearly with increase of the square root of the scan rate, indicating a diffusion controlled electron transfer (Fig. 3(b)) [26]. The coefficient of correlations were $r^2=0.996$ and $r^2=0.998$ for cathodic and anodic peaks, respectively showing a high controlled reversibility of the process.

Amino groups of the CNTs were used to promote a covalent binding with the HA via amide bond. HA is a member of the glycosaminoglycan class of natural polysaccharides that encloses several carboxylic groups. Subsequently, HA-CNT mixer was activated by adding an aliquot of EDC/NHS solution. The EDC reacts

with the carboxyl groups of the HA to form EDC-reactive O-acylisourea intermediates. Conversely, NHS stabilizes the amine-reactive intermediate and increases the efficiency of EDC-mediated coupling reactions. Situ activation of carboxyl groups of HA yields NHS-ester-terminated regions that are susceptible to nucleophilic attack from amines found in amino CNTs to form covalent amide bonds [27]. A schematic design of the HA-CNT linkage and HbcAg immobilization is shown in Fig. 4.

SEM micrographies were performed to study the conformational structures of HA-CNT hydrogels. The present activation with EDC/NHS confirmed the efficiency of HA being adsorbed at the CNT interface performing single structure (Fig. 5(a)). It could also suggest that HA molecules wrap the carbon nanotubes and remain strongly adsorbed at their interface during and after gelation. These strong interactions explain the stability of HA-CNT biogels. In contrast, without EDC/NHC activation, it is observed that the HA molecules do not involve the CNTs and do not prevent CNTs unbundling (Fig. 5(b)).

3.3. Immobilization of Hbc and glycine blocking

The immobilization of Hbc was confirmed by CV. When HbcAg was incubated onto the electrode surface, there was an obvious decrease of the redox current peaks (curve c, Fig. 6) demonstrating that Hbc antigens were immobilized on the electrode surface. The reason for the decrease of peak current is that the transmission of electrons toward the electrode surface is hindered by Hbc proteins due to their insulating nature. Next, glycine was added onto the electrode surface to block possible remaining active sites and avoided the non-specific adsorption. Finally, when anti-Hbc was captured, the peak current decreased again (curve d), indicating the successful capture of anti-Hbc and the formation of hydrophobic immunocomplex layer impeding the electron transfer.

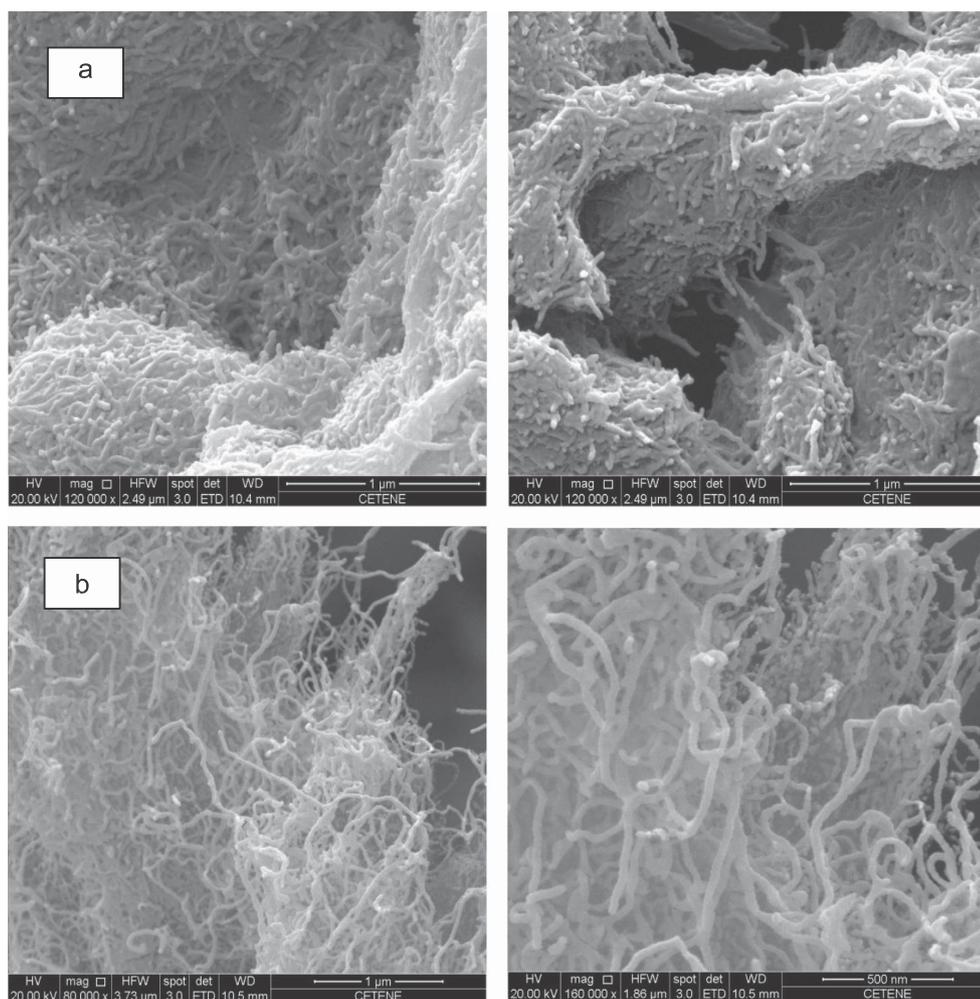


Fig. 5. SEM micrographs of HA-CNTs (a) after EDC/NHS activation (b) control (without EDC/NHS activation).

Therefore the electrode modified by HbC/HA-CNT film could be used for the detection of anti-HBc.

3.4. Analytical response to the anti-HBc

Under optimized experimental conditions, the analytical curve of the immunosensor was obtained. The HbC-GCEs were incubated under various concentrations of anti-HBc for 20 min and submitted to the SWV measurements. In prior measurements, HbC-GCEs were washed with PBS and water and immersed in the electrochemical cell containing the $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol L^{-1}) in PBS (5 mmol L^{-1} , pH 6.5) as support electrolyte. The calibration curve indicated a gradual decrease in SWV current peaks proportional to the increase of the anti-HBc concentrations as expected due to insulating nature of proteins that hinder the electronic transfer (Fig. 7(a)). The plot of analytical curve was obtained from difference between blank, and data was adjusted to a linear regression equation, $\Delta I_p = 7.78 [\text{anti-HBc}] - 4.11$ (ng mL^{-1}), a correlation coefficient of 0.991 ($p \leq 0.01$) and a low relative error ($\leq 1\%$) were obtained (Fig. 7(b)). Based on the SWV of the blank and slope of the calibration curve, the LOD was calculated as:

$\text{LOD} = 3 \text{ (RSD/slope)}$.

The immunosensor exhibited a lower LOD (0.034 ng mL^{-1}) than previously described for anti-HBc electrochemical immunosensors. Clinical levels found for anti-HBc detection are between 2.0 ng and 5.0 mL [28]. In this work, both the detection limit and the linearity range are found in the magnitude of clinical range for anti-HBc antibodies detection. Thus, this biosensor is shown as a promising tool for use in screening blood bank testings.

4. Conclusions

A label-free immunosensor was developed to detect anti-HBc antibodies. Anti-HBc is a valuable marker for use in the blood banks, the objective of screening donors, since it indicates a prior contact with the virus at any time in life. Many immunosensors using HBsAg and anti-HBs have been described, however it seems to be the first report in the literature. The detection limit and linear range achieved are comparable to conventional used methods. The high performance seems probably due to the

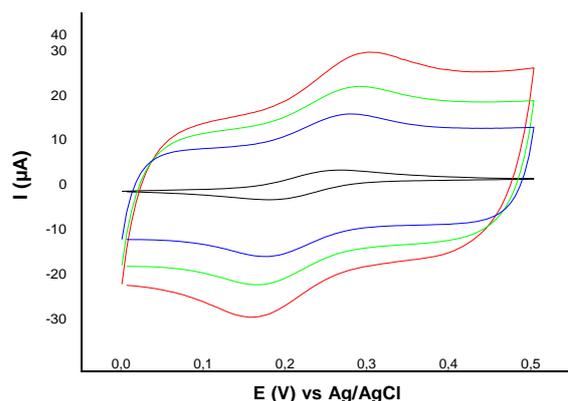


Fig. 6. Cyclic voltammograms of stepwise modification of the GCE. (a) bare GCE; (b) HA-CNT/CGE; (c) HbC/HA-CNT/CGE, and (d) Glycine/HbC/HA-CNT/CGE. Potential range from 0.0 V to 0.5 V, at 100 mV/s scan rate in 5 mmol L⁻¹ of K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ prepared in 0.1 mol L⁻¹ of KCl.

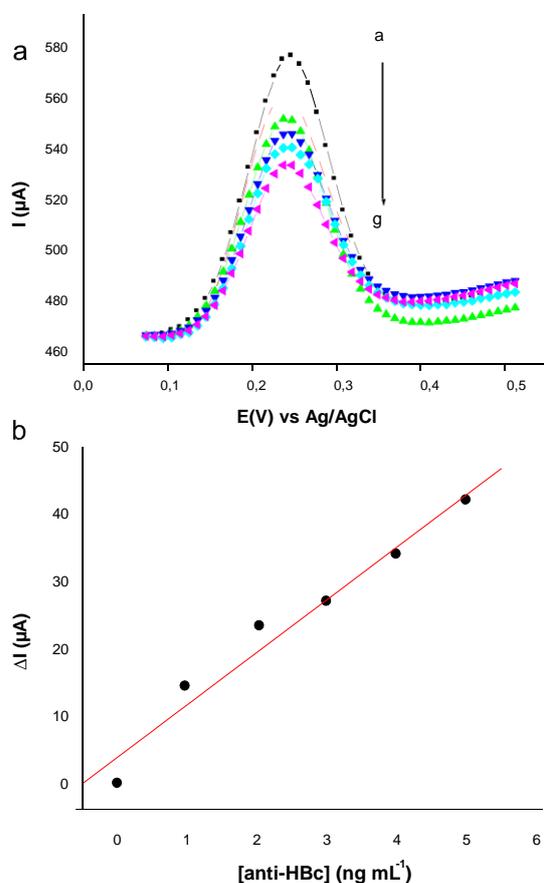


Fig. 7. (a) SWV curves of analytical responses to different concentrations of anti-

CN)

as redox probe: (a) blan

HbC obtained in 5 mmol L solution, curves b–g represent 1–6 ng mL⁻¹ anti-HbC. (b) Fit of relationship between ΔI and anti-HbC concentrations.

synergic HA-CNT effect that enabled a great amount of immobilized antigen and allowed an increase on the electron transfer that led to a high diagnostic sensitivity.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Grants No. 485643/2013-8 and No. 407905/2013-8 and the Pernambuco State Foundation (FACEPE). G.A. Cabral would like to thank the Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES) for his scholarship. The assistance of the Northeast Center for Strategic Technologies (CETENE) is also acknowledged.

References

- [1] D. Lavanchy, Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures, *J. Viral Hepat.* 11 (2) (2004) 97–107.
- [2] A.S. Patil, A. Shankarkumar, Hepatitis B diagnosis in blood bank: evaluation and challenges, *MGM J. Med. Sci.* 2 (2) (2015) 83–89.
- [3] A.S. Lok, B.J. McMahon, Chronic hepatitis B: update 2009, *Hepatology* 50 (3) (2009) 661–662.
- [4] L.J. Deng, Y. Xu, J. Huang, Developing a double-antigen sandwich ELISA for effective detection of human hepatitis B core antibody, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (6) (2008) 515–526.
- [5] B. Rehermann, M. Nascimbeni, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (3) (2005) 215–229.
- [6] M.H. Emar, N.E. El-Gammal, L.A. Mohamed, M.M. Bahgat, Occult hepatitis B infection in Egyptian chronic hepatitis C patients: prevalence, impact on pegylated interferon/ribavirin therapy, *Virol. J.* 7 (2010) 324.
- [7] H.T. Chung, J.S.K. Lee, A.S.F. Lok, Prevention of posttransfusion hepatitis B and C by screening for antibody to hepatitis C virus and antibody to HbC, *Hepatology* 18 (5) (1993) 1045–1049.
- [8] S.K. Aoki, D. Finegold, I.K. Kuramoto, C. Douville, C. Richards, R. Randell, L. Fernando, P.V. Holland, J.B. Zeldis, Significance of antibody to hepatitis B core antigen in blood donors as determined by their serologic response to hepatitis B vaccine, *Transfusion* 33 (5) (1993) 362–367.
- [9] T.R.J. Holford, F. Davis, S.P.J. Higson, Recent trends in antibody based sensors, *Biosens. Bioelectron.* 34 (1) (2013) 12–24.
- [10] A.C. Dias, S.L. Gomes-Filho, M.M. Silva, R.F. Dutra, A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein, *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 216–221.
- [11] J.M. Moon, Y.H. Kim, Y. Cho, A nanowire-based label-free immunosensor: direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole, *Biosens. Bioelectron.* 57 (2014) 157–161.
- [12] C.-Y. Yao, W.-L. Fu, Biosensors for hepatitis B virus detection, *World J. Gastroenterol.* 20 (35) (2014) 12485–12492.
- [13] S. Sabouri, H. Ghourchian, M. Shourian, M. Boutorabi, A gold nanoparticle-based immunosensor for the chemiluminescence detection of the hepatitis B surface antigen, *Anal. Methods* 6 (14) (2014) 5059–5066.
- [14] J. Wang, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review, *Electroanalysis* 17 (1) (2004) 7–14.
- [15] X. Xing, S. Liu, J. Yu, W. Lian, J. Huang, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted film at polypyrrole-sulfonated graphene/hyaluronic acid-multiwalled carbon nanotubes modified electrode for determination of tryptamine, *Biosens. Bioelectron.* 31 (1) (2012) 277–283.
- [16] B.V. Silva, I.T. Cavalcanti, M.M. Silva, R.F. Dutra, A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T, *Talanta* 117 (2013) 431–437.
- [17] C. Zamora-Ledezma, L. Buisson, S.E. Moulton, G. Wallace, Z. Cécile, C. Blanc, A. Eric, P. Philippe, Carbon nanotubes induced gelation of unmodified hyaluronic acid, *Langmuir* 29 (32) (2013) 10247–10253.
- [18] G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol. Lett.* 29 (1) (2007) 17–25.
- [19] M. Mori, M. Yamaguchi, S. Sumitomo, Y. Takai, Hyaluronan-based biomaterials in tissue engineering, *Acta Histochem. Cytochem.* 37 (1) (2004) 1–5.
- [20] A. Dhanasingh, J. Salber, M. Moeller, J. Groll, Tailored hyaluronic acid hydrogels through hydrophilic prepolymer cross-linkers, *Soft Matter* 6 (2010) 618–629.
- [21] S.L.R. Gomes-Filho, A.C.M.S. Dias, M.M.S. Silva, B.V.M. Silva, R.F. Dutra, A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T, *Microchem. J.* 109 (2013) 10–15.
- [22] and thionine mixed graphene sheet, *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 224–229.
- [23] H.V. Tran, R. Yougnia, S. Reisberg, B. Piro, N. Serradji, T.D. Nguyen, L.D. Tran, C.

- Z. Dong, M.C. Pham, A label-free electrochemical immunosensor for direct, signal-on and sensitive pesticide detection, *Biosens. Bioelectron.* 31 (1) (2012) 62–68.
- [24] J. Zhang, Y. Wang, R. Lv, L. Xu, Electrochemical tolazoline sensor based on gold nanoparticles and imprinted poly-o-aminothiophenol film, *Electrochim. Acta* 55 (12) (2010) 4039–4044.
- [25] A.J. Bard, L.R. Faulker, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second ed., John Wiley and Sons, New York, 2001.
- [26] F. Haque, M.S. Rahman, E. Ahmed, P.K. Bakshi, A.A. Shaikh, A cyclic voltammetric study of the redox reaction of Cu(II) in presence of ascorbic acid in different pH media, *Dhaka Univ. J. Sci.* 61 (2) (2013) 161–166.
- [27] Z. Pei, H. Anderson, A. Myrskog, G. Dunér, B. Ingemarsson, T. Astrup, Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity, *Anal. Biochem.* 398 (2) (2010) 161–168.
- [28] W.J. Miller, Serological assays, in: R.W. Ellis (Ed.), *Hepatitis B Vaccines*, Clinical Practice, Inc., New York, 1993, p. 126.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- A utilização de nanotubos de carbono associados a polímeros amino/carbóxi reativos resultou em maior reprodutibilidade dos filmes nanoestruturados, maior transferência eletrônica e área superfície/volume;

- A funcionalização de nanotubos de carbono constitui numa das possibilidades de fácil ancoramento de biomoléculas;

- Os protótipos desenvolvidos permitiram a detecção de anticorpos contra o core do vírus da hepatite B (anti-HBc) em níveis de interesse clínico para uso em amostras sanguíneas, sem necessidade de diluição ou pré-concentração e possibilitam o desenvolvimento de testes rápidos de baixo custo e de alta reprodutibilidade comparado aos eletrodos impressos convencionais de tinta de carbono e ouro.

11- REFERÊNCIAS:

AHUJA, T. et. al., Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, 28, (5); 791-805, 2007.

ALAM, M.Z. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**,14(5):499-503, 2009.

ALIZADEH, K.; PAROOI, R.; HASHEMI, P.; REZAEI, B.; GANJALI, M.R. A new Schiff's base ligand immobilized agarose membrane optical sensor for selective monitoring of Mercury ion. **Journal of Hazardous Materials**, 186; 1794-1800, 2011.

AMÂNCIO, M.C.; CALDAS, R.A. Biotecnologia no contexto da Convenção de Diversidade Biológica: análise da implementação do Art. 19 deste Acordo. **Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente**. 22: 125-140, 2010.

ANDRADE, R.A.; ARAÚJO, M.S.S.; REIS, A.B.; GONTIJO, C. M. F.; VIANNA,L.R.; MAYRINK,W.; MARTINS-FILHO,O.A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128: 79-86, 2009.

ANDRESEN K et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine International Health**, 2(5): 440-444. 1997.

ARAGÃO, F. J. L. Organismos transgênicos: explicando e discutindo a tecnologia. **Barueri-SP: Manole**, 2003.

ATTAR ZJ et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropical**, 78: (1): 11-16, 2001.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R.; Electrochemical methods: fundamentals and applications. **New York: Wiley**, p. 856, 2010.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2ª edição. New York: **Ed. Wiley India**, 827p, 2006.

BAUZER, L.G. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 102, 1–12; 2007.

BERGMANN, B. R. A Nanotecnologia : da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

BICUDO, R.C.S. Nanopartículas de ácido hialurônico produzidas por nanoprecipitação e reticulação química: processos e caracterização. **Dissertação de mestrado- Engenharia Química- Universidade Estadual de Campinas.** 172pp. 2011.

BLUMBERG BS, ALTER HJ, VISNICH S. A "new" antigen in leukemia sera. **The Journal of American Medical Association- JAMA-** 191:541-546, 1965.

BOUSSAA, S. et al. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. **Acta Tropica** 95, 86–91; 2005.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications. New York: **Ed. Oxford University Press**, 464p, 1993.

BRITO, P.J.; SANTHANAM,K.S.; AJAYAN,P.M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 41 (1), 121-125,1996.

BUCKO, M. et.al. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. **Chemical Papers**, 66-11; 983-998, 2012.

CABRAL, D.G.A Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de anticorpos dirigidos contra proteína do nucleocapsídeo vírico da hepatite b. **Dissertação- Mestrado em Biologia celular e molecular aplicada** – Instituto de Ciências Biológicas- Universidade de Pernambuco, 51p. 2014.

CACCIOLA, G.; ANTONUCCI, V.; FRENIS, S. Technology up date and new strategies on fuel cells. **Journal of Power Sources**, 100, 67-79, 2001.

CALLISTER JR, W.D. Materials Science and engineering: an introduction. 4^a ed., **Wiley- New York**, 1996.

CARIDADE, C.I.M.G.B. Eletrodos de filme de carbono: caracterização e aplicações em sensores e biossensores eletroquímicos. **Tese- Doutorado em Química** – Universidade de Coimbra. 245p. 2008.

CHAN, W. C. W. Bionanotechnology Progress and Advances. **American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, p. 87-91, 2006.

COLTRO, W.K.T. Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica. **Dissertação- Mestrado em Ciências (Química analítica)**- Instituto de química de São Carlos- Universidade de São Paulo. 156p. 2004.

COSSART, YE. Australia antigen and hepatitis: a review. **Journal of Clinical Pathology**, 24(5): 394-403 1971.

COSNIER, S. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 377-3: 507-520, 2003.

CUNNINGHAM B. T. Label-free biosensors: an introduction, **Cambridge University Press**, vol. 5, 2008.

DANE DS, CAMERON CH, BRIGGS M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **The Lancet**1(7649):695-698, 1970.

DAVIDSON, R.L. Handbook of the water- soluble gums and resins. **Mc-Graw Hill**, 1980.

DE PAOLI, M.A. Degradação e Estabilização de Polímeros. Livro. **Ed.Chemkeys**, 2^a versão on-line revisada. 221p. 2008.

DIAS, A.C.M.; GOMES-FILHO, S.L.R.; SILVA, M.M.S.; DUTRA, R.F. A sensor tip based on carbono nanotube- ink printed electrode for the dengue vírus NS1 protein. **Biosensors & Bioelectronics**. 44, p- 216-221, 2013.

DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A.; Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical. Chemistry**.78, 3887,2006.

DOGLAS, A.; SKOOG, F; JAMES HOLLER; TIMOTHY A NIEMAN. Principios de Análise Instrumental, **Bookman**, Porto Alegre, 2002.

DOURADO Z.F.S. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, 36(3) 205-214, 2007.

FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology** 18, 71–80; 2004.

FÉLIX, F.S. Novos materiais para aplicações analíticas nas determinações de compostos orgânicos de interesse farmacêutico e ambiental. **Tese – Doutorado em Química**- Instituto de Química- Universidade de São Paulo- 139p. 2009.

FERREIRA , F. A. P. Impacto do diagnóstico das hepatites B e C na qualidade de vida em doadores voluntários de sangue. **Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2010.

FISA, R. et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 78(5): 741-744, 2008^a.

FLECK, M.P.A. O instrumento de avaliação de qualidade de vida da Organização Mundial da Saúde (WHOQOL-100): características e perspectivas. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, 5 (1); 33-38, 2000.

FREIRE, A. C. DE S.; VASCONCELOS, H. C. A. DE. Doação de sangue: conhecimento, prática e atitude de acadêmicos de enfermagem de uma instituição do interior do Ceará. **Rev Min Enferm.** a DOI: 10.5935/1415-2762.20130023 br/jun; 17(2): 296-303; 2013.

FREITAS, T.A. Desenvolvimento de eletrodos baseados em carbono para determinação da troponina t cardíaca humana. **Tese- Doutorado em Biotecnologia. Renorbio-** Universidade Federal de Pernambuco. 100p. 2014.

FONSECA, J. C. F. História Natural da Hepatite B Crônica. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, 40 (6): 672-677, 2007.

FORATTINI, O. P. *Epidemiologia Geral*. São Paulo, Edusp, 1ª ed., 1976.

GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L.; GOMES, C.M.C; CORBETT, C.E.P. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99: 889-893, 2004.

GARCIA-ALJARO, C.; CELLA,I.N.; SHIRALE,D.J.; PARK,M.; MUÑOZ,F.J.; YATES,M.V.; MULCHANDANI, A. Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of microorganisms. **Biosensors and Bioelectronics** 26 (4), 1437-1441, 2010.

GARCÍA-GARCÍA J.A. et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, 44: 4455-4458,2006.

GAVGANI A.M., KHADEM VATAN S., GHAZANCHAEI A. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. **African Journal of Biotechnology**, 7(7): 852-859, 2008.

GOMES- FILHO, S.L.R.; DIAS, A.C.M.S.; SILVA, B.V.M.; DUTRA, R.F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal** 109, p-10-15, 2013.

GONTIJO C.M.F., MELO M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3): 338-349, 2004.

HASCALL, V. C.; LAURENT, T. C.; Hyaluronan: structure and physical properties.
Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.

Acesso em: 20/03/2015.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology** 27 (9), 2011.

HASHEMI, P.; ZARJANI, R.A.; ABOLGHASEMI,M.M.; OLIN,A. Agarose film coated glass slides for preparation of pH optical sensors. **Sensors and Actuators B**, 121; 396-400, 2007.

HASHEMI, P.; ZARJANI,R.A. A wide range PA optical sensor with mixture of neutral red and thionin imobilized on na agarose film coated glass slide. **Sensors and Actuators B**. 135; 112-115, 2008.

HEDGE,R.N.;HOSAMANI,R.R.; NANDIBEWoor,S.T.Voltametric oxidation and determination of cinnarizine at glassy carbono electrode modified with multi-walled carbono nanotubes. **Colloids and surfaces B, Biointerfaces**, 72(2), 259-265, 2009.

HIRST, E.R., ET. AL. Bond-rupture immunosensors- A review. **Biosensors &Bioelectronics**. 23-12: 1759-1768, 2008.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª edição. São Paulo: **Ed. Bookman**, p.1056, 2009.

HUERTA-ANGELES, G.; NEMCOVÁ, M.; PRIKOPROVÁ, E.; SMEJKALOVÁ, D.; PRAVDA, M.; KUCERA, L.; VELEBNY, V. Reductive alkylation of hyaluronic acid for the synthesis of biocompatible hydrogels by click chemistry. **Carbohydrate Polymers**, 90, 1704-1711, 2012.

HUGHES, T. V.; CHAMBERS, C. R.; **U.S. patent. 405,480** 1985.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon . **Nature**, 354; 54-58, 1991.

JAIN, K.J.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**- artigo aceito para publicação, 2015.

JERONIMO, S.M. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** 36, 443–449; 2004.

KAFI, A. K. M.; CROSSLEY, M. J. Synthesis of a conductive network of crosslinked carbon nanotube/hemoglobin on a thiol-modified Au Surface and its application to biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, 42, 273-2013.

KALLEL K. et al. Asymptomatic bearing of *Leishmania infantum* among Tunisian HIV infected patients. **Pathologie Biologie**, 55: 521-524, 2007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9 : 604-615, 2011.

KOLLING, G.J.; BATISTA E SILVA, M.B.; SÁ, M.C.N.P. O Direito a saúde no Sistema prisional. *Revista Tempus- Actas de Saúde Coletiva* p. 281-297, 2013.

LAINSON, R. and RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 100, 811–827; 2005.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta** 568(1-2): 200-210, 2006.

LEITE, D.S.; MUNHOZ, L.L. Biotecnologia e melhoramento das variedades de vegetais: cultivares e transgênicos. **Revista Veredas do Direito** 10(19): 23-44, 2013.

LINDENBERG, A.S.C. Infecção pelo vírus da hepatite B em Mato Grosso do Sul: Variações genômicas e infecção oculta. **Tese- Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias-** Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 131p. 2013.

LOPES, T.G.S.L.; SCHINONI, M.I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**,10(3); 337-344, 2011.

LU, X.; WANG, X.; JIN, J.; ZHANG, Q.; CHEN, J. Electrochemical biosensing platform based on amino acid ionic liquid functionalized graphene for ultrasensitive biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, 62, 134 - 2014.

MACDIARMID, A.G. “ Synthetic metals”: A novel role for organic polymers (nobel lecture). **Angewantde Chemie International Edition**, 2001.

MADOU, M. J.; Fundamentals of Microfabrication, 2nd ed., **CRC Press**: NewYork, 2002.

MATHERS, C.D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A.D. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 1(2), 2007.

MEDEIROS,E.S.; OLIVEIRA,J.E.; CONSOLIN-FILHO,N.; PATERNO,L.G.; MATTOSO,M.C. Uso de Polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos** 7.2, 62-77, 2012.

MENDES T., PITELLA A.M. Recentes Avanços em Hepatites. São Paulo, **Fundo Editorial BYK**, 1994.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Revista Química Nova**, 34 (5), 831-840, 2011.

MENEZES, C.E.L. Desenvolvimento de nanoimunossensor capacitado interdigitado para detecção de anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B. **Dissertação – Mestrado em Engenharia Biomédica**- Universidade Federal de Pernambuco. 75p. 2014.

MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; DELL VALLE, M. & ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **Trac-trends Analytical Chemical**, 24: 826, 2005.

MORAES, F.C. Nanotubos de carbono no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Tese-Doutorado em Ciências (Físico-química)**- Universidade Federal de São Carlos- São Paulo. 144p. 2010.

MOREIRA, C.S.; , LIMA, A. M.N., NEFF, H.; NETO, A.G.B; LOUREIRO, F.C.C.L.; FILHO, C. A. S.; JUNIOR, L.H.C.L. Biosensores: Tecnologia e Aplicações. **CONNEPI- IFAL**, 2010.

MOULTON, S.E.; MAUGEY, M.; POULIN, P.; WALLACE, G.G. Liquid Crystal Behavior of Single-Walled Carbon Nanotubes Dispersed in Biological Hyaluronic Acid Solutions. **Journal Chemical American Society**, 129, 9452-9457, 2007.

MÜELLER, F.; FERREIRA, C.A.; AMADO, F.D.R.; RODRIGUES, M.A.S. Desenvolvimento de membranas e filmes auto-suportadas a partir de polianilina: síntese, caracterização e aplicação. **Polímeros**. 21(4), 259-264, 2011.

NASCIMENTO, E.L. et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Cadernos de Saúde Pública** 24, 2964–2967; 2008.

NAVARRO, N.C.R.; DOMINGUES, E.R.; SOUSA, R.; FERREIRA, P.; FIGUEIREDO, F.M. Protonic conductivity and viscoelastic behaviour of Nafion_® membranes with periodic mesoporous organosilica fillers. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39; 5338- 5349, 2014.

NETO, C.R.S et.al. Biotecnologia para a saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES setorial** 29; 359-392, 2009.

NORDÉN, B.; KRUTMEIJER, E. The nobel prize in chemistry. **Conductive Polymers**, kungl Veternskademien, 2000.

OLIVEIRA, F.C.M. Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos utilizando eletrodos modificados com filme de bismuto. **Dissertação- Mestrado em Química** (Química analítica); Instituto de Química – Universidade de São Paulo. 120p. 2008.

OLIVEIRA, N.M.P. Biossensor para detecção do antígeno específico da próstata. Dissertação – **Mestrado em Biologia Molecular e Celular**. Universidade de Aveiro 88p. 2011.

OLIVEIRA, J.E; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C.; MEDEIROS, E.S. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, 8.1- 1-11, 2013.

ONOFRE, N.A. Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata. **Dissertação- Mestrado em Engenharia Biomédica**- Universidade Federal de Pernambuco. 111p. 2014.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. **Rio de Janeiro: Cultura Médica**, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Hepatitis B. **Disponível em:** http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf.

OSHAGHI, M.A. et al. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. **Experimental Parasitology** 126, 445–450; 2010.

OSTERYOUNG, J.; SCHREINER, M. M. Recent Advances in Pulse Voltammetry. **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.19, p.S1-S27, 1988. Supplement 1

PALCHETTI, I., MASCINI, M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. **Analyst**, 133-7: 846-854, 2008.

PARK, B.W., YOON, D.Y., KIM, D.S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. **Biosensors & Bioelectronics**. 26-1: 1-10, 2010.

PASSOS, R.F.C. Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos para análises rápidas. **Tese-Doutorado em Ciências- Química analítica**- Instituto de Química- Universidade Estadual de Campinas – São Paulo. 139p., 2010.

PEREIRA, P.C.D. Biocompatibilidade e principais aplicações dos Nanotubos de carbono. **Monografia- Especialização em Microbiologia** – Universidade Federal de Minas Gerais. 37p., 2009.

PEREIRA,L.M.; MARTELLI, C.M.; MERCHÁN-HAMANN, E.; MONTARROYOS,U.R.; BRAGA, M.C.; DE LIMA, M.L.; CARDOSO, M.L.; TURCHI, M.D.; COSTA, M.A.; DE ALENCAR, L.C.; MOREIRA, R.C.; FIGUEIREDO, G.M.; XIMENES, R.A. Hepatitis Study Group: Population- based multicentric survey of hepatitis B infection and risk fator differences among three regions in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 81(2); 240-247, 2009.

PERLES, C.E. Propriedades Físico-Químicas Relacionadas ao Desenvolvimento de Membranas de Nafion® para Aplicações em Células a Combustível do tipo PEMFC. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 18(4); 281-288, 2008.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, 12, 1. 2014.

PINHEIRO, A.C.; CERQUEIRA,M.A.; SOUZA,B.W.S.; MARTINS,J.T.;TEIXEIRA,J.A.; VICENTE,A.A. Utilização de revestimentos/ filmes. **Boletim de Biotecnologia**, 2010.

RAHMAN, M.M; AHAMMAD, A.J.S; JIN J.H. ET AL. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. **Sensors**. v.10, p.4855–4886,2010.

RICCARDI, C. DOS S.; COSTA,P.I.DA; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, 25-2, 316-320, 2002.

RICCI, F.; ADORNETTO, G., PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, 84; 74-83, 2012.

RIGO, R.S.; RIGO, L.; HONER, M.R. Aspectos clínicos e laboratoriais na leishmaniose visceral americana. **Barzilian Journal of Nephrology**, 31(1); 48-54, 2009.

RIVAS, G.A.; RUBIANES, M.D.; RODRÍGUEZ, M.C.; et.al. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta** 74(3), 291-307, 2007.

RODRIGUEZ, C.M.B.; PALETA, R.A.; MÁRQUEZ, J.A.R.; FERIA, O.S. Study of Electrical Resistance on the Surface of Nafion 115® Membrane Used as Electrolyte in PEMFC Technology Part I: Statistical Inference. **International Journal of Electrochemical Science**. 4; 43-59, 2009.

SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene** 104, 406–411; 2010.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20– 31, 2007.

SANTOS, J. P. Avaliação do teor e análise qualitativa do ágar das espécies *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldmann and *G. Hamel* (Gelidiales, rhodophyta) e *Gracilaria dominensis* (Kützinger)

sonder ex dickie em costões rochosos dos municípios de Ilhéus e Uruçuca. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** .Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 94p. 2011.

SANTOS, J. C. C. - Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. **Dissertação(Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Básica)** - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 94 p. 2012.

SARACENI, C.P. Vigilância das hepatites virais: a experiência de Vargem Grande Paulista, 1997-1999. **Dissertação- Mestrado em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia.** Universidade de São Paulo, 124p. 2001.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, 30-3; 489-511, 2012.

SAÚDE, M. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de bolso- **Secretaria de Vigilância em Saúde- Brasília**, 444p. 2010.

SCHANTÉ, C.; ZUBER, G.; HERLIN, C.; VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 469–489, 2011.

SCLIAR, M. História do conceito de saúde. **PHYSIS: Revista Saúde Coletiva**, 17(1): 29- 41, 2007.

SHERLOCK S. Progress report: hepatitis-associated (Australia) antigen. **British Society of Gastroenterology -Gut**.11(2):185-188,1970.

SILVA, M.A.L.; MEDEIROS, R.A.; BRANDÃO-FILHO, S.; MELO, F.L.; MEDEIROS, Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista Eletrônica de Farmácia** 3 (3): 1-15, 2010.

SILVA, B.V.M; CAVALCANTI, I.T.; SILVA,M.M.S.; DUTRA,R.F. A carbono nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**. 117, 431-437, 2013.

SILVA, M.M.S. Contribuição de nanomateriais no desenvolvimento de biossensores para diagnóstico da infecção aguda da dengue. **Tese- Doutorado em Biotecnologia- Renorbio- Universidade Federal de Pernambuco**. 148p. 2014.

SOUSA, A.M.M. Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis. Dissertação- Mestrado Integrado em Engenharia Química

SOUTO, D.E.P.; SILVA, J.V.; MARTINS, H.R.; REIS, A.B.; LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics** 46; 22-29, 2013.

SOUZA, P.V. Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados. **Tese- Doutorado em Ciências Biológicas**- Universidade Federal de Pernambuco. 125p. 2014.

SOUZA, D. ; MACHADO, S.A.S; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Revista Química Nova** 26 (1); 81-89, 2003.

SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA L. A.; MACHADO S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Revista Química Nova** 27 (5), 790-797, 2004.

SPAIN, E.; KOJIMA, R.; KANER, R. B.; WALLACE, G. G.; O'GRADY, J.; LACEY, K.; BARRY, T.; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. **Biosensors and Bioelectronics**, 26, 2613, 2011.

SPECTER, S. Viral hepatitis: diagnosis, therapy, and prevention. Totowa, NJ, EUA. **Humana Press Inc.** 1999: 1.

SRIVASTAVA, R. M.; DE FREITAS FILHO, J. R.; DA SILVA, M. J.; DE MELO; STADLBAUER, V. Comparison of 3 different multi analyte point-of-care devices during clinical routine on a medical intensive care unit. **Journal of Critical Care**.26, 433.e1-433.e11, 2011.

STEPHEN, A.M., Food Polysaccharides and their Applications, **Marcel Dekker Inc.**, New York,1995.

TARALLO, V.D. et al. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. **Acta Tropica** 116, 227–234; 2010.

TELES, F.R.R ., FONSECA, L.R. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, 77-2: 606-623, 2008.

THÉVENOT, D.;TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification IInternational Union of purê and applied chemistry: physical chemistry division, commision I.7(biophysical chemistry);Analytical chemistry division, commision V.5 **Electroanalytical Biosensors and Bioelectronics**, V.16, n.1-2, p-121-131, 2001.

TROJANOWICZ, M.; HITCHMAN, M.L. A potentiometric polypyrrole- based glucose biosensor. **Electroanalysis** 8 (3);263-266, 1996.

VIACAVAL, F.; UGÁ, M.A.D.; PORTO, S.; LAGUARDIA, J.; MOREIRA, R.S. Avaliação de Desempenho de Sistemas de Saúde:um modelo de análise. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, 17(4); 921-934, 2012.

VIDOTTI,M; CARVALHAL, R. F.;MENDES, R. K.;FERREIRA,DANIELLE C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. **Journal Braziliam Chemical Society**, 22, 1, 3-20, 2011.

VO-DINH.T.; B.CULUM. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 366 (6-7); 540-551, 2000.

WANG, J.; WANG, L.; DI, J.; TU,Y. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. **Talanta**, 77.(4), 1454-1459, 2009.

www.insumos.com.br - **Revista Aditivos &Ingredientes**– As grandes Gomas- Acesso 18/07/15 as 15:20.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Control of the leishmaniasis- Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis - **WHO Technical Report Series 949**, 1–186: 2010.

WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 26(4): 644-645, 2011.

YOSHIMURA, C. Y. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilariadomingensis* e de *Gracilaria caudata* na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 163 p, 2006.

ZELADA-GUILLÉN, G.A.; BHOSALE, S.V.; RIU, J.; RIUS, F.X. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. **Analytical Chemistry**, 82, 22, 9254-9260. 2010.

ZHUANG, H. Updates of EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**; 20(6) 427-429, 2012.