

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

ANNE KELLY SANTANA DA SILVA

IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
CARBONO E ORTOFENILENEDIAMINA PARA DETECÇÃO DA HEPATITE C

Recife

2018

ANNE KELLY SANTANA DA SILVA

IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE
CARBONO E ORTOFENILENEDIAMINA PARA DETECÇÃO DA HEPATITE C

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Linha de pesquisa: Instrumentação Diagnóstica e Terapêutica.

Orientador (a): Prof^a. Dra Rosa Amália Fireman Dutra

Recife

2018

Catálogo na fonte

Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

S586i	Silva, Anne Kelly Santana da. Imunossensor amperométrico baseado em nanocompósito de carbono e ortofenilenediamina para detecção da hepatite C / Anne Kelly Santana da Silva. - 2018. 54folhas, Il., e Abr. Orientadora: Prof^a. Dra Rosa Amália Fireman Dutra. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2018. Inclui Referências. 1. Engenharia Biomédica. 2. Imunossensor. 3. Nanotubos de carbono. 4. Poli-ortofenilenodiamina. 5. Hepatite C. I. Dutra, Rosa Amália Fireman. (Orientadora). II. Título UFPE 610.28 CDD (22. ed.) BCTG/2018-337
-------	--

ANNE KELLY SANTANA DA SILVA

**IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM
NANOCOMPÓSITO DE CARBONO E ORTOFENILENODIAMINA
PARA DETECÇÃO DA HEPATITE C**

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

Orientadora: Prof^a. Dra Rosa Amalia Fireman Dutra

Aprovada em: 21/02/2018

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Doutora pela Universidade de Campinas, Campinas, Brasil.

Prof^a Dra. Adriana Fontes, UFPE

Doutora pela Universidade de Campinas, Campinas, Brasil.

Prof^a. Dra. Rosa Amalia Fireman Dutra (Presidente)

Doutora pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

**“Confie no Senhor de todo o seu coração e
não se apoie em seu próprio entendimento;
reconheça o Senhor em todos os seus caminhos,
e ele endireitará as suas veredas”**

Provérbios 3: 5-6

RESUMO

Nos últimos anos, os dispositivos biossensores baseados em nanomateriais têm sido bastante pesquisados pela alta sensibilidade alcançada devido principalmente às propriedades atrativas introduzidas pelos materiais, tais como aumento de área eletroativa, maior transferência eletrônica, alta razão superfície/volume, além da melhoria da relação sinal/ruído, reduzindo as correntes de “background”. As aplicações de metodologias de desenvolvimento mais simples e práticos que, por exemplo, possam requerer apenas um único passo, oferecem maiores chances de aquisição de sensores mais reprodutíveis e acurados. No presente estudo, um imunossensor baseado em nanocompósito de poli-ortofenilenodiamina (PoPD) e nanotubos de carbono (NTC) foi desenvolvido para detecção direta de anticorpos anti-HCV aplicados ao diagnóstico da Hepatite C. O filme nanocompósito de PoPD-NTC foi obtido sobre eletrodo de carbono vítreo em uma única etapa, utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. A alta especificidade da interação estreptavidina/biotina foi estrategicamente empregada na construção da plataforma sensora para permitir uma maior imobilização do antígeno HCV. As técnicas de voltametria cíclica e de varredura linear foram empregadas para detecção livre de marcação do anti-HCV em amostras de soro enriquecida. O sinergismo entre NTC e PoPD melhorou a condutividade da superfície do sensor, aumentando em 1,8 vezes a área eletroativa, em relação ao PoPD, permitindo a detecção de flutuações na barreira de difusão decorrentes das interações antígenos-anticorpos. Condições ótimas para eletrossíntese do filme nanocompósito foram padronizadas: concentração do monômero de 15 mM e 10 varreduras cíclicas (-0,8 a 0,8 V) a uma velocidade de 20 mV/s. O imunossensor apresentou alta sensibilidade para detecção do anti-HCV com medidas realizadas por técnica de voltametria linear (- 0,2 a 0,8 V), velocidade de varredura 50 mV/s em sonda de 5mM de ferro/ferricianeto de potássio em 0,1M de KCl. Diante dos resultados, conclui-se que o imunossensor proposto pode ser considerado promissor para uso no diagnóstico do HVC.

Palavras-chave: Imunossensor. Nanotubos de carbono. Poli-ortofenilenodiamina. Hepatite C.

ABSTRACT

In recent years, biosensors based on nanomaterials have been well researched because of the high sensitivity due to the attractive properties introduced by the materials, such as increase in electro-area, greater electron transfer, high surface/volume ratio, noise reduction by reducing the background currents. The applications of simpler and more practical development methodologies that, for example, may require only a single step, offer a better chance of acquiring more reproducible and accurate sensors. In the present study, an immunosensor based on poly-orthophenylenediamine (PoPD) and carbon nanotubes (CNT) was developed for the direct detection of anti-HCV antibodies applied to the diagnosis of Hepatitis C. The nanocomposite film of PoPD-CNT was obtained on glassy carbon electrode in a single step, using the electrochemical technique of cyclic voltammetry. The high specificity of the streptavidin/biotin interaction was strategically employed in the construction of the sensor platform to allow greater immobilization of the HCV antigen. Cyclic and linear scanning techniques were employed for anti-HCV labeling free detection in enriched serum samples. The synergism between CNT and PoPD improved the conductivity of the sensor surface, increasing by 1.8 times the electroactive area, in relation to PoPD, allowing the detection of fluctuations in the diffusion barrier due to the antigen-antibody interactions. Optimum conditions for electrosynthesis of the nanocomposite film were standardized: monomer concentration of 15 mM and 10 cyclic scans (-0.8 to 0.8 V) at a rate of 20 mV/s. The immunosensor showed high sensitivity for anti-HCV detection using measurements of linear voltammetry (- 0.2 to 0.8 V), scanning speed 50 mV/s in a probe of 5mM of potassium ferrocyanide/ferricyanide, in 0.1M KCl. In view of the results, it is concluded that the proposed immunosensor can be considered promising for use in the diagnosis of HCV.

Keywords: Nanocomposite. Carbon nanotubes. Poly-orthophenylenediamine. Immunosensor. Hepatitis C.

Lista de Ilustrações

Figura 1-	Apresentação do Vírus da hepatite C	15
Figura 2-	Ciclo de vida da hepatite C	17
Figura 3-	Representação de um teste de tira lateral	21
Figura 4-	Esquema da formação do imunocomplexo, com ausência de marcação <i>label-free</i>	22
Figura 5-	Ilustração de um Monitor de Glicemia Pessoal	24
Figura 6-	Montagem de uma célula eletroquímica com um sistema trieletródico	24
Figura 7-	Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica e anódica	25
Figura 8-	Representação da Voltametria de Onda Quadrada	27
Figura 9-	Estrutura química do Orto-fenilenediamina	28
Figura 10-	Esquema de formação do polímero de orto-fenilenediamina	29
Figura 11-	Diagramas esquemáticos do nanocompósito	30
Figura 12-	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes	31
Figura 13-	Esquema geral da construção da plataforma imunossensora	36
Figura 14-	VCs de diferentes eletrodos em diferentes concentrações de oPD	38
Figura 15-	Otimização dos parâmetros de eletropolimerização	39
Figura 16-	Voltamogramas cíclicos comparativos do ECV eletropolimerizado	41
Figura 17-	Voltamogramas da estabilidade eletroquímica do nanocompósito	42
Figura 18-	Estudo de concentração da Estreptavidina	43
Figura 19-	SWVs das sucessivas incubações com HCV-Biot	44
Figura 20-	Curvas de Voltametria linear e SWVs	45
Figura 21-	Avaliação da resposta sensora	46

Lista de Abreviaturas

HBV-	Vírus da Hepatite B
HCV-	Vírus da Hepatite C
CHC-	Carcinoma Hepatocelular
ECLIA-	Ensaio por quimioluminescência (<i>Electrochemiluminescence Immunoassay</i>)
ELISA-	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
HNANB-	Hepatite Não-A Não-B
NTC-	Nanotubos de Carbono
OMS-	Organização Mundial de Saúde
PCR-	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
POCT-	Point-of-care testing
SWV-	Voltametria de onde quadrada
VC-	Voltametria Cíclica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	HEPATITE C: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	14
2.2	MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECÇÃO SÉRICA DE ANTICORPOS ANTI-HCV	18
2.2.1	Imunoanalísadores	19
2.2.2	Testes Imunocromatográficos	20
2.2.3	Imunossensores	21
2.3	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS AMPEROMÉTRICAS	24
2.4	FILMES POLIMÉRICOS	27
2.4.1	Filmes baseados em orto-fenilenodiamina	28
2.5	NANOMATERIAS APLICADOS EM IMUNOSSENSORES	30
2.5.1	Nanotubos de Carbono	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	REAGENTES	34
4.2	EQUIPAMENTOS E MEDIÇÕES	34
4.3	FORMAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE PoPD-NTC	35
4.4	CO-IMOBILIZAÇÃO DO ANTÍGENO HCV	35
4.5	DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DO ANTI-HCV	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	FILME NANOESTRUTURADO PoPD-NTC: SÍNTESE E ESTUDO DE ESTABILIDADE	37

5.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO NANOCOMPÓSITO PoPD-NTC	40
5.3	IMOBILIZAÇÃO DO HCV-BIOT	41
5.4	BLOQUEIO DE LIGAÇÕES NÃO ESPECÍFICAS	43
5.5	RESPOSTA ANALÍTICA DO IMUNOSENSOR	44
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As hepatites virais são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade em todo o mundo e demandam altos investimentos em seus tratamentos. Atualmente existem cinco principais vírus da doença (A, B, C, D, E), sendo considerados os da Hepatite B (HBV) e da Hepatite C (HCV), os mais importantes problemas para a saúde pública (ALVES et al., 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 185 milhões de pessoas, aproximadamente 3% da população mundial, estejam infectadas com o HCV, figurando entre as principais causas de doenças crônicas hepáticas, como cirrose, hepatocarcinoma e mortes relacionadas ao fígado, além de ser a causa primária de transplantes desse órgão (JOYCE & TYRREL, 2010). No Brasil, estima-se que a prevalência do vírus seja de 2,6%, aproximadamente, 3 milhões de pessoas, enquanto a prevalência mundial deste vírus é de 2,2%, dos quais os locais mais acometidos são a África, Sudoeste Asiático e o Oriente Médio, apresentando menor prevalência em países industrializados (KUNRATH et al. 2014).

O contágio do HCV é frequentemente via parenteral, podendo ocorrer também de modo vertical ou sexualmente. Como muitos portadores do vírus são assintomáticos, torna-se difícil o controle da doença (ABREU *et al.*, 2013). Cerca de 80% dos infectados cronificam a doença provocando grande impacto econômico ao setor da saúde (KOHILI *et al.*, 2014). Uma das maneiras de se prevenir a evolução e a transmissão da doença, principalmente em países pobres ou com recursos impactados, é o desenvolvimento de metodologias alternativas práticas, rápidas e de baixo custo para rastreio do HCV, não comprometendo sua sensibilidade e especificidade diagnóstica.

Os testes de rastreio (“point-of-care testing” – POCT), são testes que atendem a essas demandas, sendo considerados na atualidade, uma das possibilidades analíticas mais atrativas quando comparadas àquelas representadas por imunoanalisadores automatizados que utilizam as metodologias de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e eletroquimioluminescência (ECLIA, do inglês - *Electrochemiluminescence Immunoassay*), além dos métodos moleculares de diagnóstico, realizados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). A indústria diagnóstica e, em número cada vez maior, os usuários de testes rápidos nos Estados Unidos e na Europa são unânimes em afirmar que os POCTs são considerados uma tendência a curto, médio e longo prazo (MATTOS, et al., 2012). Entre as diversas vantagens, os POCTs fornecem resposta rápida (resultado em poucos minutos), a amostra é não-transportada, a

etapa analítica (processamento) é simplificada, os analistas podem ser experientes ou iniciantes e oriundos de diferentes áreas da saúde (enfermeiras, médicos, etc). Um dos exemplos de POCTs são os testes imunocromatográficos, usualmente chamados de “tiras de fluxo lateral”, que combinam o princípio da cromatografia com o imunoensaio convencional para oferecer uma análise de custo relativamente baixo. Entretanto, a leitura visual da tira é normalmente limitada a um sim / não como resposta, o que não é adequado, quando o nível do analito é importante. Sendo assim, muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento do POCTs quantitativos, que possam oferecer informações sobre a concentração exata do analito de interesse, o que pode ser obtido através da tecnologia dos biossensores (BEDIN, *et al.*, 2017; ACWAN *et al.*, 2017).

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos bioanalíticos, composto por um elemento biológico (como sensor) ligado a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado pela ligação com o analito alvo (IUPAC, 2016). Dentre os diversos tipos de biossensores, em termos de transdução, os eletroquímicos que convertem a interação bioquímica em um sinal elétrico (corrente, potencial, por exemplo) consistem, muitas vezes, de eletrodos impressos por tintas de carbono que são acoplados a sistemas dedicados de conversão elétrica ou mesmo a potenciostatos portáteis, tornando estes dispositivos de fácil portabilidade, baixo custo e práticos. Desta forma, estes dispositivos eletroquímicos apresentam-se como candidatos ideais para testes de rastreio quantitativos, permitindo a detecção de patógenos como antígenos circulantes, anticorpos, etc. presentes em sangue e outros fluidos biológicos (SILVA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, com o advento da nanotecnologia, novas estratégias de integração de nanomateriais às superfícies sensoras têm permitido grande melhoria na sensibilidade diagnóstica dos imunossensores. Entre os nanomateriais mais usados destacam-se os nanotubos de carbono (NTC) que podem ser facilmente funcionalizados com a introdução de grupos reativos, possibilitando o acoplamento estável de proteínas e ligações covalentes (VASCONCELOS, *et al.*, 2009). A funcionalização pode ser realizada combinando os nanomateriais com compostos contendo grupos químicos como tióis aminas, carboxílicos, álcoois e fosfatos, ou pelo uso de estruturas orgânicas como as polilisinas, organosilanos, polieletrólitos, entre outros (BARSAN, *et. Al.*, 2015). A modificação e/ou a combinação de NTCs com filmes poliméricos tem permitido novas estratégias eletroanalíticas que passam a apresentar melhor desempenho pela alta transferência eletrônica e área superficial eletródica.

Neste trabalho, eletrodos de carbono vítreo foram revestidos com poli-o-fenilenediamina (PoPD), um polímero contendo amino grupos, obtido através da

eletrossíntese do orto-fenilenodiamina (1,2-diaminobenzol, o-PD) em meio ácido (SHUMYANTSEVA *et al.*, 2016). A fim de se ter um maior controle da superfície nanoestruturada, NTCs carboxi-funcionalizados foram co-eletropolimerizados simultaneamente ao o-PD, possibilitando a síntese, em uma única etapa, de um filme estável sobre a superfície sensora. Em seguida, a imobilização de moléculas biorreceptoras (epítomos HCV) foi realizada explorando a alta constante de afinidade biotina-avidina. Antígenos de contra epítomos do HCV foram imobilizados via estreptavidina ao filme de NTC-PoPD por uma ligação estável. Ao final, foi possível realizar a detecção de anticorpos anti-HCV através da técnica de voltametria de onda quadrada e linear. Os níveis de detecção dos anticorpos são compatíveis com os testes laboratoriais imunossorológicos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HEPATITES C: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

As hepatites virais são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade em todo o mundo e demandam altos investimentos em seus tratamentos. Atualmente existem cinco principais agentes etiológicos (A, B, C, D, E), sendo considerados os mais importantes problemas para a saúde pública os vírus da Hepatite B (HBV) e o da Hepatite C (HCV) (ALVES *et al.*, 2014). O perfil de cronicidade das hepatites B e C, faz com que elas sejam as principais responsáveis pelo desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) em todo o mundo. Sendo também responsável por uma grande parte dos casos de cirrose (MITTAL & EL-SERAG, 2013).

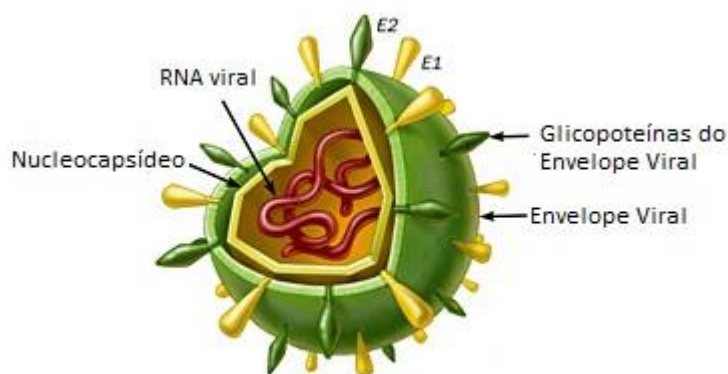
Até 1975, apenas dois vírus da hepatite tinham sido identificados, o "infeccioso vírus da hepatite" (vírus da hepatite A, VHA) e "vírus da hepatite sérica" (vírus da hepatite B, VHB). No entanto, aproximadamente 65% das hepatites pós-transfusionais não eram diagnosticadas como causadas pelo VHA e nem pelo VHB, então esses casos foram denominados "hepatite não A, não-B" (HNANB) (FEINSTONE *et. al.*, 1975; SCHEUER *et. al.*, 1992).

Estudos feitos com a inoculação de derivados do sangue humano contaminados com o vírus NANB em chimpanzés (*Pan troglodytes*) identificou um aumento persistente de alanina aminotransferase no soro, indicando que um agente infeccioso foi a causa da doença (ALTER *et.al.*, 1978; HOLLINGER *et. al.*, 1978). Posteriormente, foi demonstrado que o agente da HNANB poderia ser inativado por clorofórmio (FEINSTONE *et. al.*, 1983). Além disso, foi relatado que o agente infeccioso foi capaz de passar através de filtros de membrana de 80 nm (BRADLEY *et. al.*, 1985). Tomados em conjunto, esses achados sugeriram que o agente causador da NANBH seria um pequeno vírus com um envelope lipídico. No entanto, a falta de um sistema adequado de cultura de células para o cultivo de HNANB e a disponibilidade limitada de chimpanzés impediu uma maior caracterização do agente causador da HNANB por muitos anos (SCHAFF *et. al.*, 1984)

Em 1989, usando uma estratégia de clonagem recentemente desenvolvida para ácidos nucleicos derivados do plasma de chimpanzés infectados com HNANB, o genoma do principal agente causador da HNANB foi caracterizado (CHOO *et. al.*, 1989). O correspondente vírus infeccioso causador da maioria dos casos de HNANB foi posteriormente denominado vírus da hepatite C (HCV).

O HCV é um vírus pequeno, membro do gênero hepacivírus dentro da família *Flaviviridae* (STAPLETON *et. al.*, 2011; SCHAFF *et. al.*, 2015), formado por um envelope esférico contendo tetrâmeros (ou dímeros de heterodímeros) de glicoproteínas (E1 e E2) e internamente eles possuem um nucleocapsídeo que abriga o genoma viral (RNA) de cadeia simples de aproximadamente 9,6 kb (HELLER, 2005, WAKITA, 2005, YU, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Apresentação do Vírus da hepatite C.



Fonte: Adaptada de <https://www.jhmicall.org>

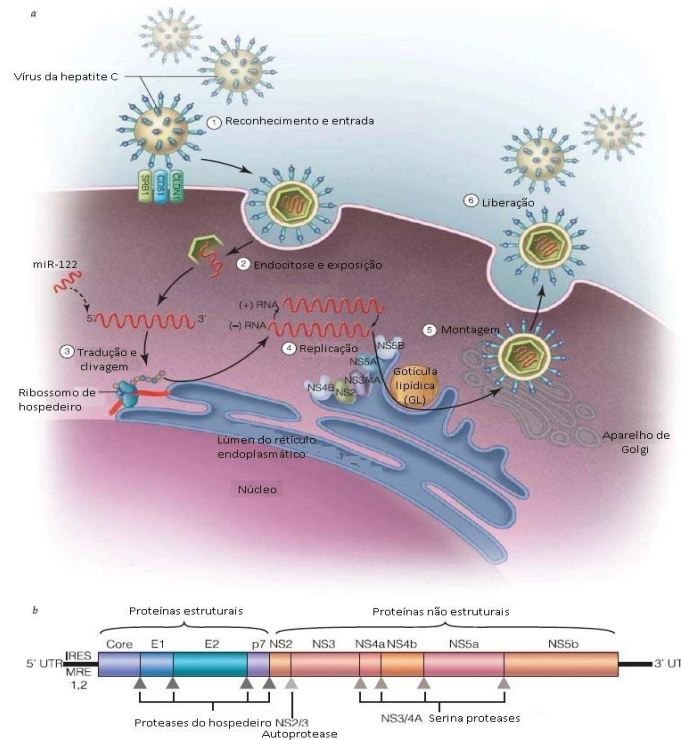
Existem seis genótipos conhecidos de HCV (KOHLI, *et. al.*, 2014). Porém, um estudo feito por Smith *et. al.* (2014) que comparou sequências de nucleotídeos do HCV derivadas de indivíduos de diferentes regiões geográficas revelou a presença de pelo menos sete principais genótipos de HCV com um grande número de subtipos dentro de cada genótipo (MESSINA, *et. al.*, 2015). Dentre esses genótipos, o genótipo 1 caracteriza-se pela maior resistência ao tratamento antiviral (BERGMANN *et. al.* 2014).

O vírus da hepatite C é um vírus mais comumente transmitido pelo sangue. Sendo o uso de drogas injetáveis através do compartilhamento de seringas; reutilização ou esterilização inadequada de equipamentos médicos, especialmente seringas e agulhas em ambientes de saúde; e a transfusão de sangue e produtos sanguíneos não examinados são as principais vias de transmissão (BOESECKE *et.al.*, 2011; ROCKSTROH *et.al.*, 2012). O HCV também pode ser transmitido sexual e verticalmente, entretanto, estes modos de transmissão são muito menos comuns. Um maior número de parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis e falta de uso de um preservativo são alguns dos fatores que podem aumentar o risco de infecção por HCV (OHTO *et.al.*, 1994; ABREU *et al.*, 2013; Guia da hepatite C, 2014).

O período de incubação para a hepatite C varia de 2 semanas a 6 meses. Após a infecção inicial, aproximadamente 80% das pessoas não apresentam sintomas, desenvolvendo geralmente a forma crônica da doença e mantendo um processo inflamatório hepático por mais de seis meses na maioria dos casos. Aqueles que são agudamente sintomáticos podem apresentar febre, fadiga, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal, urina escura (colúria), fezes de cor cinza (hipocolia fecal), dor nas articulações, aversão a alguns alimentos e ao cigarro e icterícia, que se apresenta em cerca de 18 a 26% dos casos de hepatite aguda e inicia-se, geralmente, quando a febre desaparece. A hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia é também uma possível consequência da infecção por esse vírus. Sendo esses sintomas diminuídos paulatinamente (MERICAN *et. al.*, 1993; LAUER *et.al.*, 2001). Das pessoas infectadas e que evoluem para a forma crônica, 20 a 30% evoluem para cirrose e dos cirróticos 1 a 5% desenvolvem hepatocarcinoma (DE MARTEL, *et. al.*, 2015; EL- SERAG, *et. al.*, 2016).

Na figura 2, é ilustrado o ciclo de vida do HCV, onde o vírus circula no hospedeiro na forma de uma partícula lipoviral de lipoproteína de densidade muito baixa. Uma combinação de proteínas virais (NS4A-NS5B) e fatores do hospedeiro, incluindo ciclofilina A e microRNA-122, se faz necessária à replicação viral (POENISCH & BARTENSCHLAGER, 2010).

Figura 2. (a) Ciclo de vida da hepatite C (HCV); (b) Genoma do HCV (RNA).



Fonte: Adaptado de http://assinantes.medicinanet.com.br/conteudos/acp-edicine/6458/hepatite_viral.htm

Na etapa 1, está caracterizada a entrada do vírus nos hepatócitos, após a internalização o vírus perde o seu revestimento, expondo seu nucleocapsídeo e seu material genômico (RNA) (etapa2). Na etapa 3 ocorre o mecanismo de transdução genômica, seguido pela replicação feita no retículo endoplasmático (etapa4). A fita de RNA recém-sintetizada é então empacotada pelo aparelho de Golgi em uma nova partícula lipoviral infecciosa, que então é liberada da célula (etapas 5 e 6). Os elementos de reconhecimento do microRNA (MRE 1,2) permitem a interação com o microRNA-122 do hospedeiro, facilitando a replicação viral (Figura 2b).

Não há vacina, nem imunoglobulina para a hepatite C. Aos portadores crônicos do HCV são recomendadas as vacinas contra hepatite A e B, se forem susceptíveis, evitando o risco destas infecções (PAWLOTSKY, *et. al.*, 2015; WALKER & GRAKOU, 2015).

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECÇÃO SÉRICA DE ANTICORPOS ANTI-HCV

Existem duas abordagens distintas para o diagnóstico do HCV: (1) os métodos físicos, baseados em técnicas de imagen, como a ultrassonografia, análise por doppler, ressonância magnética, tomografia computadorizada, elastografia transitória (TE), elastografia em tempo real e força de radiação acústica; e (2) os métodos biológicos, baseados em biomarcadores séricos (VALVA *et. al.*, 2016).

Embora complementares, essas duas abordagens metodológicas são baseadas em diferentes raciocínios e concepções. Considerando-se que a doença é frequentemente apresentada de modo assintomático e que a transmissão ocorre principalmente por via parenteral (HOOFNAGLE, 1997; FOSTER *et. al.*, 1998), os métodos biológicos por marcadores séricos mostram-se mais adequados, sobretudo quando usados para fins de rastreio, identificando portadores, bolsas de sangue contaminadas, etc (EL-SERAG *et. al.*, 2016)

Atualmente, a pesquisa de anticorpos contra o HCV é indicada por ser este um dos biomarcadores mais específicos e eficazes no diagnóstico da doença. Porém como a pesquisa é realizada contra imunoglobulinas G que são produzidas contra todos os epítomos da partícula viral, não é possível identificar os sorotipos do vírus. Testes complementares como a PCR podem elucidar na identificação do genótipo viral, considerando que os genótipos do HCV respondem diferentemente ao tratamento e há a possibilidade um indivíduo infectado apresentar mais de um genótipo. Porém a PCR é sensível somente quando o vírus ainda está circulante, em fase aguda da doença. Considerando que frequentemente a doença é assintomática e que cerca de 15 a 45% das pessoas infectadas eliminam espontaneamente o vírus, a pesquisa de anti-HCV é considerada de maior valia visto que o indivíduo, uma vez infectado, perdurará com anticorpos durante toda sua vida (OMS, 2017).

A confirmação do diagnóstico da HCV pelo anti-HCV, tanto na fase aguda quanto crônica está resumida na tabela 1.

Tabela 1: Marcador Anti-HCV da Hepatite C e suas características.

MARCADOR (Anti-HCV)	FASE AGUDA	FASE CRÔNICA
1ª Testagem: Anti-HCV	-	+
2ª Testagem: Anti-HCV	+	+
	(soroconversão)	

Notas:

1. Quando encontrado no soro dos indivíduos suspeitos de infecção pelo vírus da hepatite C, este anticorpo não define se a infecção é aguda ou crônica;
2. São considerados casos de hepatite C aguda aqueles em que o indivíduo apresentou mudança documentada no perfil sorológico (soroconversão), isto é: anti-HCV Não Reagente na primeira testagem e anti-HCV Reagente na segunda, realizada após 30-90 dias.
3. Para confirmar a infecção pelo vírus da hepatite C, deve-se realizar testes de biologia molecular qualitativo (HCV-RNA).

Fonte: (Adaptado de Ministério da Saúde, 2017).

Outros marcadores são sugeridos no manejo da doença, os níveis de alanina-aminotransferase (ALT/TGP), de aspartato aminotransferase (AST/TGO) e de plaquetas, sendo estes mais correlacionados a cronicidade e preditivos de fibrose hepática (SHLOMAI & RICE, 2014).

2.2.1 Imunoanalisadores

Os imunoanalisadores atuais para detecção de anticorpos anti-HCV são baseados em imunoensaio tipo sanduíche que compreende um ensaio em fase sólida utilizando antígenos contra epítomos do HCV imobilizados em microesferas ou outros suportes para captura de anticorpos anti-HCV no soro sanguíneo (MARWAHA *et. al.*, 2014; ULIANA *et. al.*, 2014). A fim de melhorar a especificidade dos testes, são utilizadas proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para a captação do anti-HCV. A reação bioquímica é revelada a partir da interação de anticorpos conjugados à enzimas (ensaios imunoenzimáticos) ou compostos quimioluminescentes (eletroquimioluminescência).

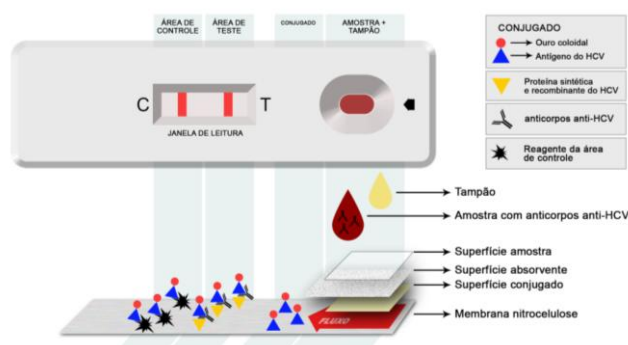
Os imunoanalísadores automatizados são ELISA e ECLIA, respectivamente, para a determinação laboratorial (BRANDÃO *et.al.*, 2001). Estes ensaios automatizados fornecem resultados quantitativos e limites de detecção na ordem de nanogramas, sendo considerados os testes de ECLIA, os mais acurados. Diversos imunoanalísadores são encontrados no mercado, com diferentes graus de aperfeiçoamento que melhoram os parâmetros diagnósticos a cada geração. Alguns analisadores encontrados são Cobas® 4800 System (Roche, Suíça) (SALMINEN *et.al.*, 2016)

Embora os ensaios realizados em imunoanalísadores automatizados apresentem resultados satisfatórios em termos de sensibilidade e especificidade diagnóstica, estes ensaios são considerados de pouca praticidade como testes de rastreio, visto que a amostra deve ser transportada ao laboratório para ser processada; exigem o envolvimento de pessoal qualificado, uma vez que processa inúmeras análises simultaneamente e envolve equipamentos de processamento não amigável, além da exposição a reagentes e amostras biológicas pelo operador, entre outras desvantagens.

2.2.2 Testes imunocromatográficos

Os testes rápidos utilizados para triagem da infecção pelo HCV baseiam-se na tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral, que permite a detecção do anticorpo anti-HCV no soro ou sangue total. Semelhantemente aos testes para anti-HCV de imunoanalísadores, estes também se utilizam de antígenos recombinantes ou proteínas sintéticas para detectar os anticorpos. A amostra de soro ou sangue é transportada pela tira e os anticorpos anti-HCV capturados pelos antígenos são conjugados, formando um imunocomplexo, semelhante a um imunoensaio convencional. As respostas são lidas uma análise visual através de uma banda de cor que é formada por nanopartículas de ouro (ouro coloidal) que apresenta uma coloração arroxeada. A confirmação do teste é, em geral, representada por duas bandas de cor, sendo uma delas relativa ao ensaio controle com outras imunoglobulinas presentes no sangue ou soro (PAROLO *et. al.*, 2013; SAJID, KAWDE, & DAUD, 2015). Na figura 3 está representado o esquema da arquitetura de um teste de tira lateral para a HCV.

Figura 3. Representação de um teste de tira lateral.



Fonte: Adaptado de BioManguinhos/FIOCRUZ.

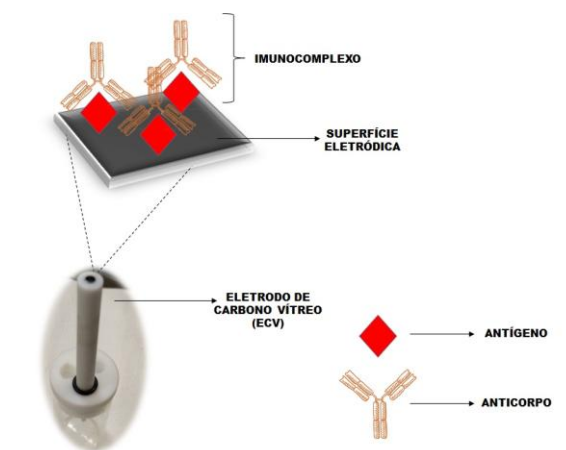
O ensaio dura cerca de 20 minutos, tempo necessário para o transporte da amostra que é diluída com solução tampão. Estes testes se prestam a uma análise *point-of-care*, à beira do leito sendo adequados como testes de rastreio. Porém como a leitura da tira é normalmente limitada a um sim / não como resposta, o que depende da análise subjetiva do operador (HWANG, LEE & CHOO, 2016).

A sensibilidade dos testes imunocromáticos chega a cerca de 70%, entretanto, estes testes são recomendados para rastreio de anti-HCV, necessitando de uma confirmação posterior mais acurada (CHEN & YANG, 2015), que é finalizada pelos testes realizados nos imunolísidos, de acordo com a recomendação do *Boletim Epidemiológico* editado pelo Minter da Saúde (2017).

2.2.3 Imunossensores

A tecnologia de biossensores é recente quando comparada a dos imunoanalisadores. A tecnologia se difere dos imunoanalisadores enzimáticos por não depender de ensaios bioquímicos. Quando anticorpos ou antígenos são utilizados, pode-se denomina-los de acordo com a biomolécula envolvida na interação de *Imunossensores*. Neste caso, a resposta da interação entre biomoléculas (anticorpos-antígeno) é convertida em um sinal elétrico de modo indireto (imunossensores marcados) ou direto (munossensores não-marcados, do inglês – “*label-free*”) (figura 4).

Figura 4. Esquema da formação do imunocomplexo, com ausência de marcação *label-free*.



Fonte: A autora.

Muitos exemplos de sensores para detecção de anticorpos anti-HCV são descritos na literatura recente (Tabela 2). Eles podem ser classificados de acordo com o tipo de transdução: óptica, eletroquímica, piezolétrica e térmica (ULIANA *et. al.*, 2014).

Tabela 2. Imunossensores para detecção de anti-HCV.

REFERÊNCIA	PRINCÍPIO DE TRANSDUÇÃO	TIPO DE DETECÇÃO	PLATAFORMA SENSORA
MA <i>et. al.</i> , 2012	Tipo sanduiche	Não-marcado	Eletrodo de Carbono Vítreo modificado com nanocompósito
MA <i>et. al.</i> , 2013	Tipo sanduiche	Anticorpo marcado com peroxidase	GMCs-MB com formação de nanocompósito
LIANG <i>et. al.</i> , 2013	Tipo sanduiche	Anticorpo marcado com peroxidase	O eletrodo de carbono vítreo foi modificado com um nanocompósito de Au-MoO ₃ /Quitosana

MORAES <i>et. al.</i> , 2013	Detecção Direta	Não-marcado	Filmes anoestruturados de fibroína sobre eletrodos impressos de pasta de carbono
------------------------------	-----------------	-------------	--

Fonte: A autora.

Dentre os diversos tipos de transdutores, os amperométricos tendem a se mostrar como os mais promissores para *testes de rastreio (POCT)*, devido à principalmente serem facilmente portabilizados, apresentar respostas rápidas, serem mais econômicos por dispensarem reagentes químicos e menos etapas de processamento. Atualmente, comercialmente, são encontrados sensores amperométricos portáteis na qual a cela eletroquímica é substituída por um eletrodo impresso, consistindo de um três eletrodos impressos de tinta carbono, ouro ou outros materiais condutores sobre um suporte rígido, tais como plásticos, PVC, vidro, etc (EDMONDS, 2013; MIRSKY, 2013).

Adicionalmente, para as medidas de correntes, são confeccionados circuitos dedicados que apresentam uma fonte de tensão controlada e microprocessador para converter as unidades de medidas de corrente em um sinal compreensível LUI *et. al.*, 2013). Desta forma, estes biossensores portáteis são considerados dispositivos práticos, que apresentam menor volume de amostra, podem ser transportados, operados com baixo consumo de energia, e apresentar um processamento amigável (KHALED *et. al.*, 2014; YU *et. al.*, 2016). Um típico exemplo ilustrativo de um sensor para glicose (glicosímetro) é apresentado na figura 5 com um modelo de monitor de glicemia pessoal da Roche® Diagnóstica (Suíça).

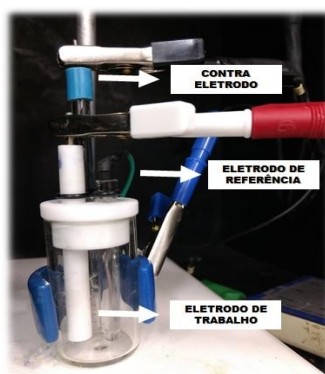
Figura 5. Ilustração de um Monitor de Glicemia Pessoal, ACCU – CHECK ADVANTAGE (ROCHE® DIAGNÓSTICA).



2.3 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS AMPEROMÉTRICAS

Nos sensores eletroquímicos convencionais, as medidas amperométricas são realizadas em uma cela eletroquímica contendo 3 eletrodos: um eletrodo de trabalho (onde ocorrem os processos eletroquímicos de interesse), um eletrodo de referência (que mantém a diferença de potencial em relação ao eletrodo de trabalho) e um contra eletrodo (utilizado para descarga de sobrepotência no eletrodo de trabalho) (Figura 5).

Figura 6. Montagem de uma célula eletroquímica com um sistema trieletródico.



Fonte: A autora.

A corrente elétrica é geralmente originada de espécies redox (eletroativas) que se movimentam no seio da solução. A direção da corrente elétrica é direcionada por meio de uma tensão elétrica que pode ser constante, linear (em rampa) ou alternada (senoidal, em

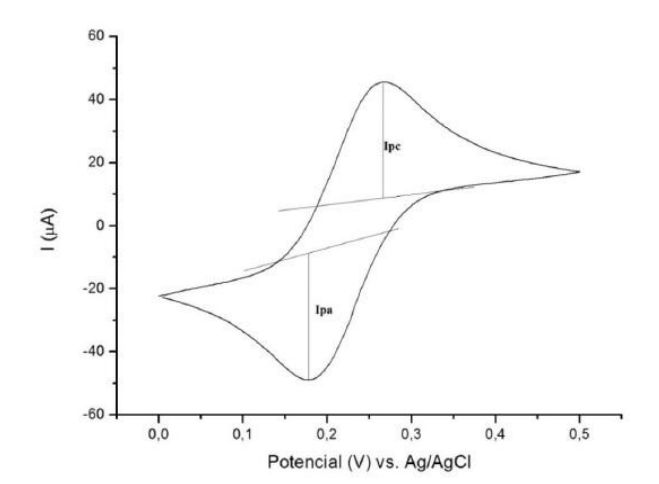
pulsos ou em impulsos). Na eletroquímica clássica, a rota de aplicação desta tensão elétrica caracteriza processos que podem usar isoladamente um tipo de tensão, ou combiná-las, assim, caracterizando as técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ), voltametria de pulso diferencial, etc (BRETT & BRETT, 1993).

No processo de caracterização e de obtenção de medidas analíticas nos imunossensores, a VC e VOQ respectivamente têm sido as mais empregadas.

Na VC realiza-se uma varredura de potencial em vários ciclos sucessivos, observando-se picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa sendo esta, a principal técnica eletroquímica utilizada para caracterizar superfícies (SADIK ET AL, 2009; KISSINGER, HEINEMAN, 1996).

Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons.

Figura 7. Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}).



Fonte: A autora.

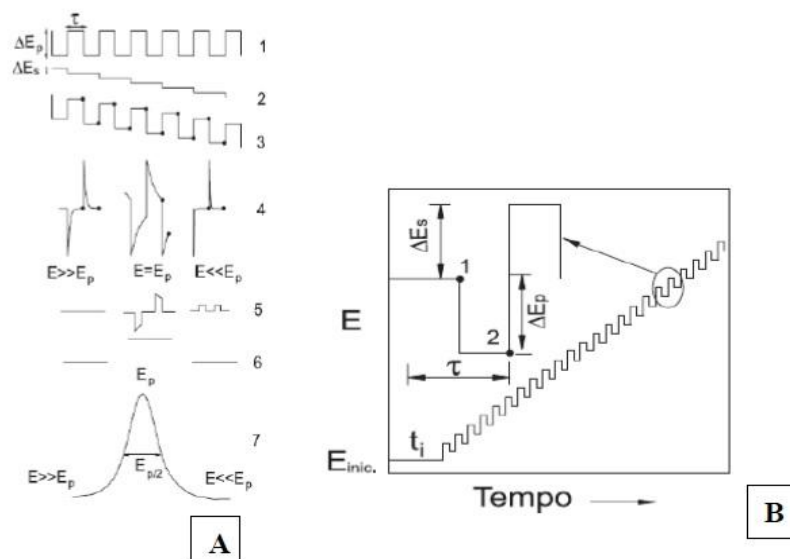
A técnica de VOQ é considerada mais sensível do que a VC na caracterização de alterações na superfície sensora. Esta tem a capacidade de apresentar a saída de corrente sob a forma de um pico simétrico e a capacidade de medir a corrente faradáica num momento em

que a dupla camada de corrente de carregamento é desprezível (KISSINGER & HEINEMAN, 1996).

Na SWV, uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (staircase) caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura a e período τ é aplicada ao eletrodo de trabalho, como representado na figura 7. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida (SCHOLZ, 2010).

O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado. Na figura 7 está também representado o pico de corrente resultante da SWV, onde o pico é caracterizado por um potencial e largura W . A sensibilidade desta técnica é comparável com aquela proveniente da voltametria de pulso diferencial. A maior vantagem desta técnica é a velocidade de aquisição dos dados. Frequências de ciclos de onda quadrada por segundo permitem o uso de velocidades de varredura de potenciais extremamente rápidas. Enquanto na voltametria de pulso diferencial a velocidade de varredura varia de 1 a 10 mV s⁻¹, na SWV esta velocidade varia de 100 a 1000 mV s⁻¹, isto diminui o tempo de análise de cerca de 3 a 5 minutos para poucos segundos (3 a 10 s) sem haver perda da resolução dos picos (VASSOS, EWING, 1983).

Figura 8. Representação da Voltametria de Onda Quadrada. 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; B: aplicação do potencial na Voltametria de Onda Quadrada.



Fonte: Souza, *et.al.*, 2003.

2.4 FILMES POLIMÉRICOS

Nos últimos anos, polímeros intrinsecamente condutores com ligações duplas conjugadas estão atraindo muita atenção como materiais avançados. Eles podem ser facilmente sintetizados através de meios químicos ou eletroquímicos em meios aquosos e não aquosos. A síntese eletroquímica é mais conveniente, porque o polímero pode ser depositado diretamente na superfície de um fio metálico com melhor resistência mecânica do que as fibras de sílica originalmente utilizadas em microextração de fase sólida (SPME) (BEHZADI *et.al.*, 2013).

Em contraste com os polímeros condutores, a eletrosíntese dos não-condutores é auto-limitada e inevitavelmente cessa quando a película de polímero no eletrodo cresce o suficiente para se tornar também resistivo para a transferência de elétrons entre o eletrodo e os monômero e radicais presentes na solução. Como consequência, a espessura do polímero não condutor, são bastante finos (aproximadamente 10 a 100nm), dependendo da resistividade real, que é muito mais fino que os típicos filmes de polímeros condutores já bastante

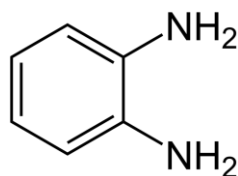
conhecidos (como polipirrol, aproximadamente 0.5mm). Apesar de finos, esses filmes podem ser utilizados de forma altamente sensível e seletiva na construção de sensores (HU & CHEN, 2010).

2.4.1 Filmes baseados em orto-fenilenediamina

Um exemplo de polímero não condutor amplamente utilizado na formação de plataformas sensora molecularmente impressas (MIP) é o poli-orto-fenilenediamina (PoPD), formado por monômeros de orto-fenilenediamina (OPD), estes formam filmes finos com várias funções, dependendo das condições de eletrólise utilizadas para a sua preparação (CHIBA, *et al.*, 1987), sendo sua utilização em imunossensores, uma inovação.

Orto-fenilenediamina (OPD) é um composto orgânico com a fórmula $C_6H_4(NH_2)_2$. Esta diamina aromática é um importante precursor de muitos compostos heterocíclicos. É membro de uma classe de derivados da anilina com um grupo NH_2 extra em posição orto, meta ou para (isômeros), sendo o OPD o membro mais estudado do grupo (BEHZADI *et.al.*, 2013). Esse composto apresenta um padrão de insolubilidade em solventes orgânicos (CHIBA, *et al.*, 1987). A figura 9 ilustra a estrutura química desse composto.

Figura 9. Estrutura química do Orto-fenilenediamina (OPD).



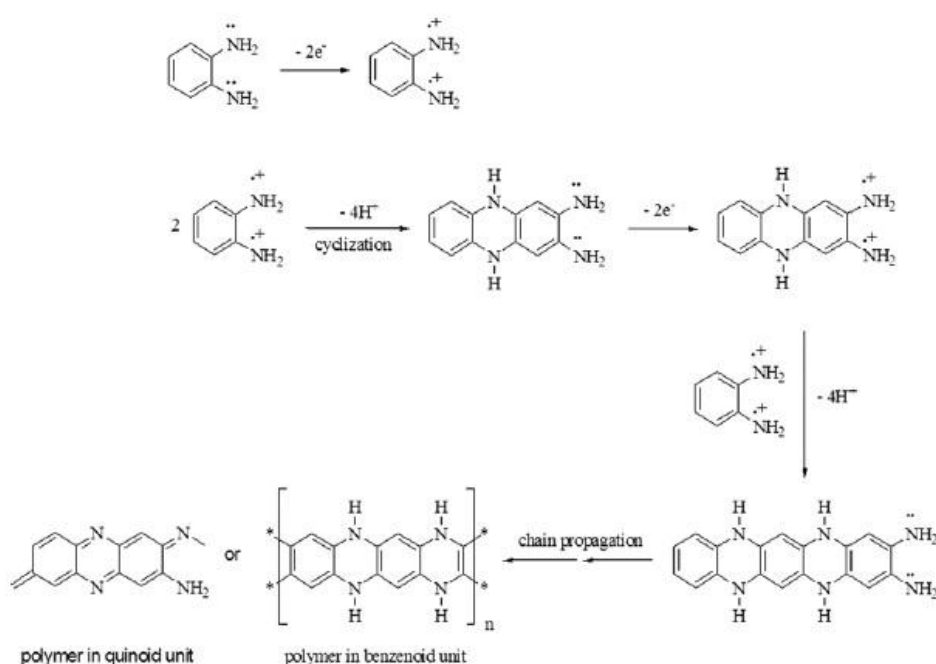
Fonte: IUPAC (2018).

A estrutura dos filmes de PoPD e seus mecanismos de formação são conhecidos por ser complexos e foram estudados com algum detalhe por muitos autores. As propriedades do PoPD foram sugeridas para depender principalmente das condições da polimerização, tais como pH, composição eletrolítica, temperatura e potencial aplicado. Os filmes de PoPD eletropolimerizados a pH neutro e temperatura ambiente, demonstraram formar um revestimento não condutor (GOVINDARAJAN, *et.al.*, 2013).

O poli-orto-fenilenediamina (PoPD) é um polímero permeseletivo amplamente utilizado na construção de biossensores para uma variedade de analitos, como peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, ácido úrico, acetaminofeno e cisteína. PoPD pode ser depositado

eletroquimicamente a partir de soluções contendo monômeros de o-fenilenodiamina a pH neutro para produzir um polímero fino, isolante e auto-selado na superfície do eletrodo. A figura 10 mostra o suposto mecanismo de formação eletroquímica do PoPD. O monômero é inicialmente oxidado, que então sofre acoplamento químico para produzir um dímero que pode ser mais oxidado. O dímero pode ainda ser polimerizado para produzir um polímero de cadeia linear. Também pode ser ciclizado para produzir uma estrutura de escada através da polimerização dos produtos oxidados (BEHZADI *et.al.*, 2013).

Figura 10. Esquema de formação do polímero de orto-fenilenediamina (OPD).

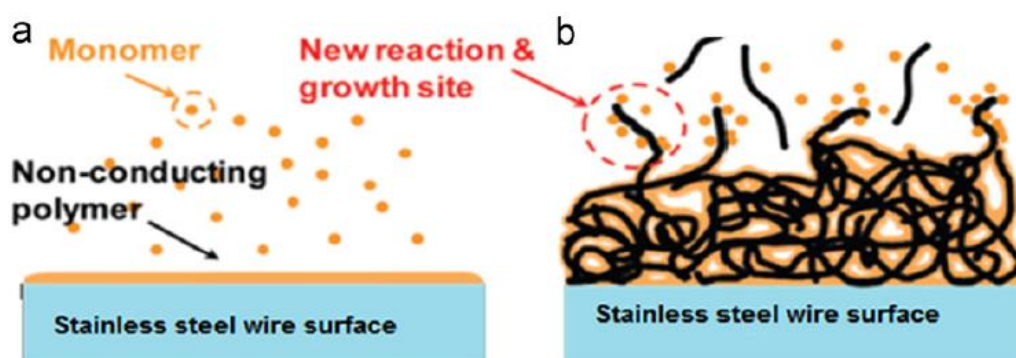


Fonte: Hu & Chen (2010).

Estudos anteriores, como o feito por MARTINUSZ & INZELT (1994) já falavam sobre esse mecanismo de formação dos filmes de OPD, mostrando que a eletropolimerização de o-fenilenodiamina assume um comportamento redox em meio ácido. A formação desse filme não se dá por meio de um processo autocatalítico e ocorre principalmente durante aplicações de potenciais negativos. Os resultados indicam que os filmes estão formados por moléculas solventes e íons em estados reduzidos e oxidados, e a extensão da composição aumenta com a espessura do filme. Na formação do filme há inicialmente uma inserção de ânions e/ou expulsão de prótons, seguido da expulsão de ânions e/ou inserção de prótons (configurando processos de protonação e desprotonação).

A introdução de NTC em uma matriz de polimérica (condutora ou não), formando um nanocompósito, melhora as propriedades elétricas, bem como mecânicas do polímero original (QIAN *et. Al.* 2000; Hu & Chen, 2010) (Figura 11).

Figura 11. Diagramas esquemáticos do nanocompósito. (a) fio de aço coberto com uma camada pura de polímero não condutor e (b) uma camada composta de polímero / MWCNT não condutor na qual os MWCNTs interligados representam os locais de eletrodo onde ocorre uma maior eletropolimerização (aumento de condução).



Fonte: Hu & Chen (2010).

2.5 NAMOMATERIAS APLICADOS EM IMUNOSENSORES

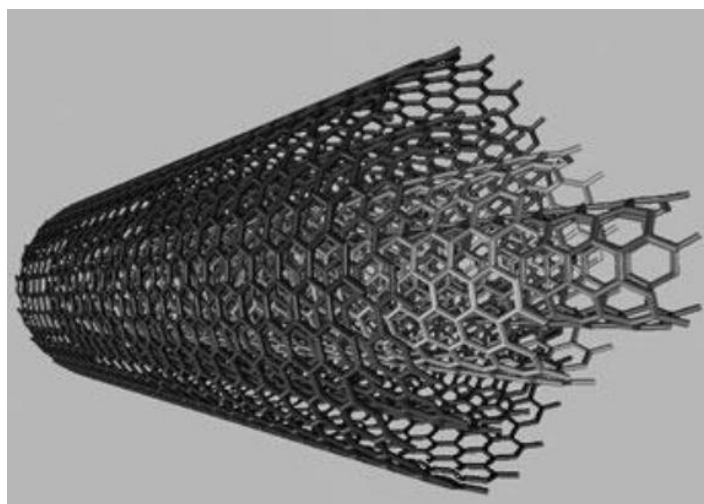
Uma das estratégias metodológicas para alcançar menores limites na detecção nos imunossensores (de níveis séricos de anticorpos, por exemplo), é o desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas. Com o crescente desenvolvimento da Nanotecnologia, os nanomateriais vêm sendo exploradas no aperfeiçoamento de biossensores amplificando e potencializando suas características intrínsecas, dentre eles podemos destacar os Nanotubos de Carbono (NTCs) (LUI *et. al.*, 2007; WAN *et. al.*, 2011; RONKAINEN & OKON, 2014).

2.5.1 Nanotubos de carbono

Os NTCs são uma nova classe de nanomateriais descobertos em 1991 por Sumio Iijima e apresentam extraordinárias propriedades mecânicas, elétricas e térmicas. Possuem a maior resistência a ruptura sob tração conhecida, na ordem de 200 GPa, 100 vezes superior ao mais resistente aço com apenas 1/6 de sua densidade. Desde sua descoberta eles têm atraído uma série de esforços de pesquisa básica devido às suas propriedades físicas e químicas únicas (área de superfície altamente acessível, excelente condutividade elétrica, alta resistência mecânica e boa estabilidade química) (QIAN *et. al.* 2000).

Estes são um novo tipo de material de carbono, conseguidos devido à torção de folhas de grafeno em cilindros de carbono, com os átomos de carbono ligados de forma covalente aos seus vizinhos. Eles possuem duas dimensões nanométricas (espessura e diâmetro), seu comprimento podendo chegar a 50 μm . Podem ser compostos de uma única folha de grafeno (single-walled carbon nanotubes - SWCNTs) ou várias folhas (multi-walled carbon nanotubes - MWNTs) (Figura 11) (GOMES-FILHO *et. al.*, 2012; WANG *et. al.*, 2003).

Figura 12. Nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWNTC).



Fonte: HERBST *et al* (2004).

Dependendo do diâmetro, disposição dimensional e quiralidade dos átomos de carbono, os NTCs podem exibir características de materiais metálicos e semicondutores, podendo ser empregados como materiais em diferentes áreas tecnológicas (LÓPEZ, 2009; QURESHI *et al.*, 2009). Recentemente, o domínio das técnicas de modificações químicas de NTCs por introdução de diferentes grupos químicos tem sido exigido pela crescente demanda dos biossensores. Neste caso, grupos funcionais proteína-reativos podem permitir a imobilização de biomoléculas de modo mais estável. Os NTCs carbóxi-funcionalizados têm

sido mais frequentemente empregados por serem facilmente preparados através de altas temperaturas ou por dispersão em meio fortemente ácido.

Além de biossensores, outras aplicações biomédicas de nanotubos de carbono incluem a entrega de drogas, nanoinjetoras, fototerapia e produção de imagens artificiais (KRUSS *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um imunossensor eletroquímico baseado em nanocompósito de nanotubos de carbono e orto-fenilenodiamina para diagnóstico imunossorológico da Hepatite C.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Padronizar eletroquimicamente a construção do filme nanocompósito de poli- orto-fenilendiamine e nanotubos sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo, quanto à concentração de monômero, número de ciclos de polimerização, transferência de elétrons e estabilidade;
- Realizar testes de co-imobilização do antígeno HCV via interação estreptavidina-biotina;
- Caracterizar a estrutura e topografia das plataformas sensoras utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de força atômica;
- Estabelecer respostas analíticas do imunossensor para detecção amperométrica do anti-HCV, empregando as técnicas de voltametria linear e de onda quadrada.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES

Os nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos (NTCs-COOH) foram adquiridos da Dropsens, Llanera (Asturias), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), dimetilsulfóxido (DMSO), orto-fenilenodiamina (OPD), ferricianeto e ferrocianeto de potássio ((K₃Fe(CN)₆ e K₄Fe(CN)₆) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O antígeno do vírus HCV biotilado (HCV-biot) e o anticorpo Anti-HCV foram obtidos da Abcam (Cambridge, Reino Unido).

O Tampão Fosfato Salino (PBS) pH 7,0 (10 mM), utilizado nas diluições de amostras e lavagens, foi preparado dissolvendo-se 0,2 g de KCl, 8,0 g de NaCl, 0,24 g de KH₂PO₄ e 1,44 g de Na₂HPO₄, em 1000 mL de água ultra-pura. As demais soluções, como tampão fosfato salino (PBS) (pH 7.4, 0.01 M). As soluções usadas nos ensaios voltamétricos foram preparadas em água ultra pura deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), obtida de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc (EUA).

4.2 EQUIPAMENTOS E MEDIÇÕES

Os testes eletroquímicos foram feitos em um sistema trieletródico contendo um eletrodo auxiliar (EA) helicoidal de platina, um eletrodo de referência (ER) de Ag/AgCl (sat. KCl) e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (ECV), em uma célula de vidro fechada, conectados a um potenciostato/galvanostato IviumCompactStat (Eindhoven, Netherlands) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software IviumSoft®. Voltamogramas cíclicos (VCs), registrados na faixa de potencial de -0.2 a 0.6 V, sob velocidade de varredura de 0.05 V/s, foram utilizados para caracterização eletroquímica das etapas de modificação do ECV. Todas as medições voltamétricas foram efetuadas em solução de 5 mM de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, preparada em KCl (100 mM), utilizado com sonda redox.

4.3 FORMAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE PoPD-NTC

Previamente à construção do filme nanocompósito, a superfície do eletrodo de trabalho foi submetida a um procedimento de limpeza manual, através do polimento da área eletródica em um tecido aveludado embebido em alumina de granulometria de 0,3 μ . Em seguida, os eletrodos foram cuidadosamente lavados em água destilada para remoção dos resíduos de alumina.

Para formação do nanocompósito uma solução de 0.2 mg/mL de NTCs-COOH e OPD (15 mM) em H₂SO₄ (100 mM) na proporção de 1:2 foi eletropolimerizada em uma única etapa sobre a superfície sensora utilizando a técnica de voltametria cíclica na faixa de potencial de -0.8 a 0.8 V sob 0.02 V/s. Os NTCs-COOH utilizados foram previamente disperso em DMSO, durante 2h em banho de ultra. Para otimização da construção do filme nanocompósito, diferentes concentrações de oPD (20 mM a 100 mM), em H₂SO₄ (100 mM), foram eletropolimerizadas sobre o ECV durante 20 ciclos voltamétricos. As modificações da superfície sensora para confirmação da eletropolimerização do oPD foram monitoradas através de VCs em solução de 5 mM de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.

4.4 CO-IMOBILIZAÇÃO DO ANTÍGENO HCV

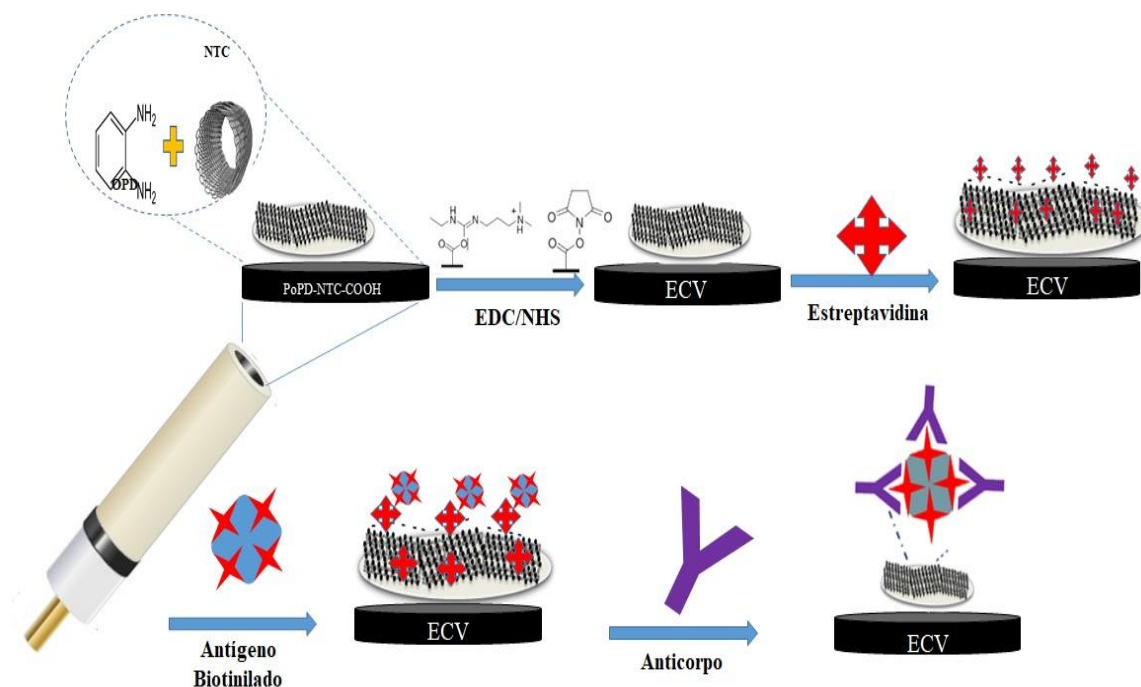
Os grupos carboxílicos ativados derivados dos NTCs no filme nanocompósito foram empregados para imobilização covalente de moléculas de estreptavidina (10 mM). Os sítios carboxílicos ECV foram, previamente, ativados com uma solução de EDC/NHS, preparadas em água ultra pura, nas concentrações de 20 e 50 mM, respectivamente, durante 45 min a temperatura ambiente. Em seguida uma solução de streptavidina (10 mM) foi mantida sobre a superfície sensora por 1h, a temperatura ambiente. O HCV-biot (100 μ g/ml) foi co-imobilizado overnight a 4°C sobre a superfície do ECV. Os sítios inespecíficos após co-imobilização do HCV-biot, que não foram ligados ao nanocompósito, foram bloqueados com uma solução de glicina (10 mM), preparada em água ultra pura, durante 30 min. Todas as etapas de incubação de biomoléculas foram realizadas em câmara úmida à temperatura ambiente (24°C).

4.5 DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DO ANTI-HCV

O desempenho analítico do imunossensor foi avaliado através de sucessivas incubações com anti-HCV (5 ng/mL) durante 30 min. Entre cada etapa, o ECV foi cuidadosamente lavado tampão PBS (pH 7.4, 10 mM). A interação entre o HCV e o anti-HCV na superfície do eletrodo foi detectada utilizando um sistema livre de marcação. A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) foi utilizada para avaliar a resposta analítica do imunossensor. As medidas foram obtidas na faixa de potencial de -0.2 a 0.8 V, sob frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e potencial de passo de 10 mV. A curva de calibração foi obtida pela diferença entre a altura dos picos de corrente (ΔI) da VPD do ECV com anti-HCV em relação ao branco, ou seja, antes da exposição às amostras de anticorpo.

Na figura 13 é apresentado a preparação do eletrodo e o esquema geral da construção da plataforma imunossensora para determinação amperométrica do anti-HCV.

Figura 13. Esquema geral da construção da plataforma imunossensora.



Fonte: A autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

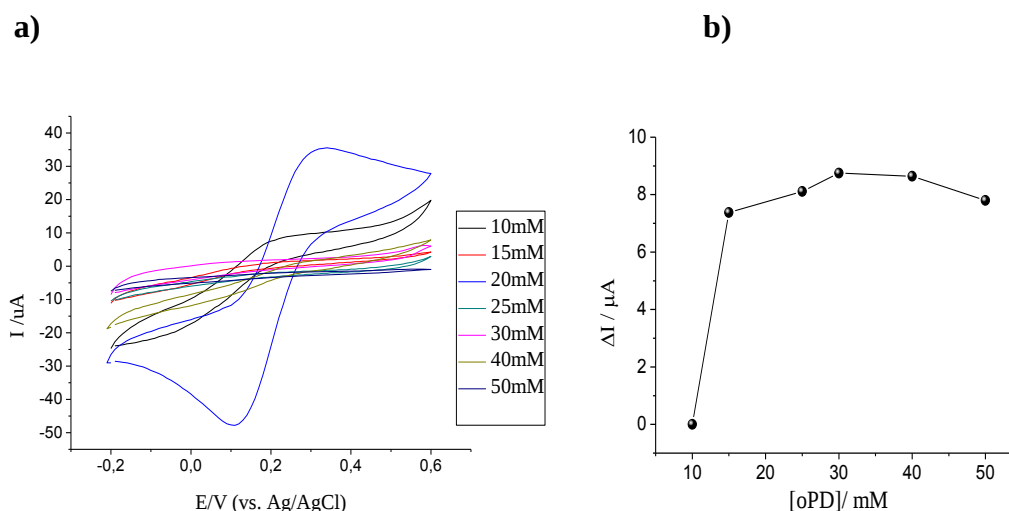
5.1 FILME NANOESTRUTURADO POPD-NTC: SÍNTESE E ESTUDO DE ESTABILIDADE

As características de filmes poliméricos quanto à condutividade, estabilidade, espessura, tamanho de cadeias e rendimento são mais controladas quando estes são sintetizados por eletropolimerização *in situ* (Mama & Ragid, 2014). A fim de alcançar uma performance eletroquímica ótima do filme polimérico para posterior integração à nanomateriais,, fez-se necessária a otimização de algumas das condições experimentais limitantes, tais como concentração do monômero de PoPD, técnica eletroquímica, etc.

- ***Determinação da concentração ótima de oPD***

Para o estudo, variou-se as concentrações de oPD em 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50mM que foram preparadas em meio ácido (0,1 M de H_2SO_4), e avaliadas segundo o perfil eletroquímico em VC na presença de sonda redox (Figura 13 (a)). Após a análise dos gráficos cartesianos obtidos da soma das amplitudes de picos anódicos e catódicos vs. à concentração de monômeros (mM), observou-se um *plateau* na concentração de 15mM de oPD. Nas concentrações acima deste valor, a condutividade expressa pelas correntes resultantes permanece praticamente constante, indicando uma saturação na oferta de monômeros para eletropolimerização. Assim, a concentração ótima de 15 mM de oPD foi adotada em todos os estudos subsequentes.

Figura 14. (a) VCs de diferentes eletrodos em diferentes concentrações de oPD; b) Efeito da concentração de oPD em relação às correntes de picos redox. Medidas de VC foram realizadas em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM) sob velocidade de varredura de 0,05 V/s.



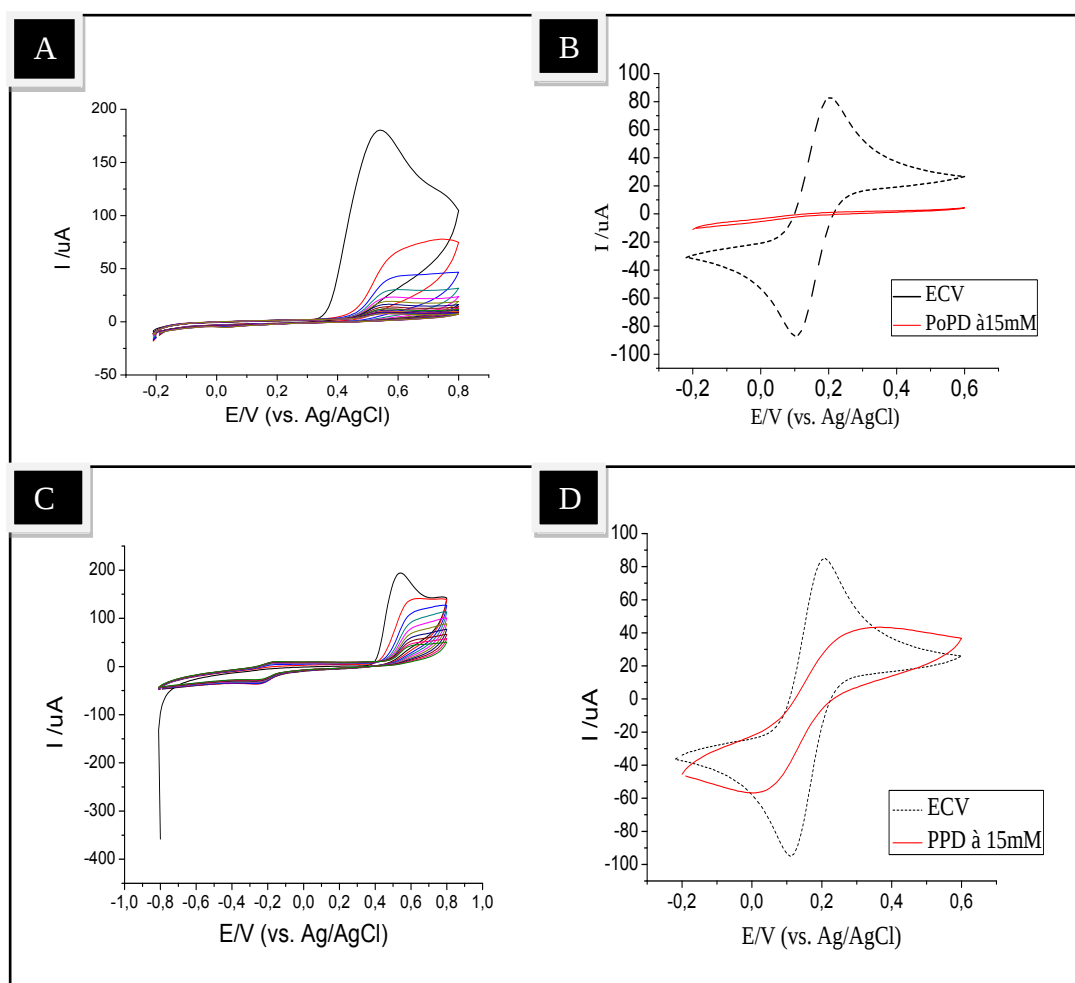
- **Determinação dos parâmetros eletroquímicos ótimos**

Após fixada a concentração de monômeros de oPD, foi realizada a determinação do número de ciclos voltamétricos suficientes para formação do polímero pOPD. Na Figura 15 (a), observa-se a uma alta corrente anódica em aproximadamente 0,5 V vs Ag/AgCl, durante o primeiro potencial do ciclo, a qual pode ser atribuída a oxidação dos grupos reativos amina dos monômeros de oPD. Nos ciclos subsequentes a largura deste pico passa a ser aumentada, bem como o aumento deste pico não é tão proeminente quanto o primeiro. Ao final do décimo ciclo, o perfil voltamétrico foi mantido praticamente constante, indicando que esse processo é praticamente estabilizado, ou seja, indicando que os monômeros presentes no seio da solução foram consumidos para a formação do polímero na superfície sensora, desta forma este número de ciclos foi considerado ótimo. Por outro lado, uma utilização de número de ciclos excessivos numa varredura cíclica poderia levar a uma possível superoxidação do polímero, reduzindo sua condutividade elétrica podendo alterar a performance do filme polimérico formado, ou mesmo desfazê-lo (BILAL, 2009).

O cuidado em se manter uma janela de potencial dos VCs adequada também é essencial para a estabilidade do filme polimérico, bem como garantir filmes menos espessos, mais regulares e com maior condutividade elétrica. Comparando-se os perfis voltamétricos

dos filmes obtidos usando janelas de potenciais distintas em relação ao eletrodo limpo, Figuras 15 (b) e 15(d), observa-se que filmes obtidos em VCs com janela com potenciais inferiores mais largos (-0.8 a 0.8 mV), (Figura 15(a)), os filmes de PoPD resultaram uma maior área eletroativa, indicando maior condutividade. Acredita-se que os picos catódicos em aproximadamente -0,2V, decorrem de redução das espécies aniônicas que auxiliam romovendo o corte nas cadeias poliméricas, tornando filmes com menor espessura e com maior condutividade.

Figura 15. Otimização dos parâmetros de eletropolimerização. A) Formação de PoPD à 15mM, janela de potencial -0.8 a 0.8 mV em um total de 10 ciclos; B) VC do eletrodo limpo (preto) e Eletropolimerizado (vermelho) com padrões citados em (a). C) Formação de PoPD à 15mM, janela de potencial -0.2 a 0.8 mV, em um total de 20 ciclos; D) VC do eletrodo limpo (preto) e Eletropolimerizado (vermelho) com padrões citados em (c)

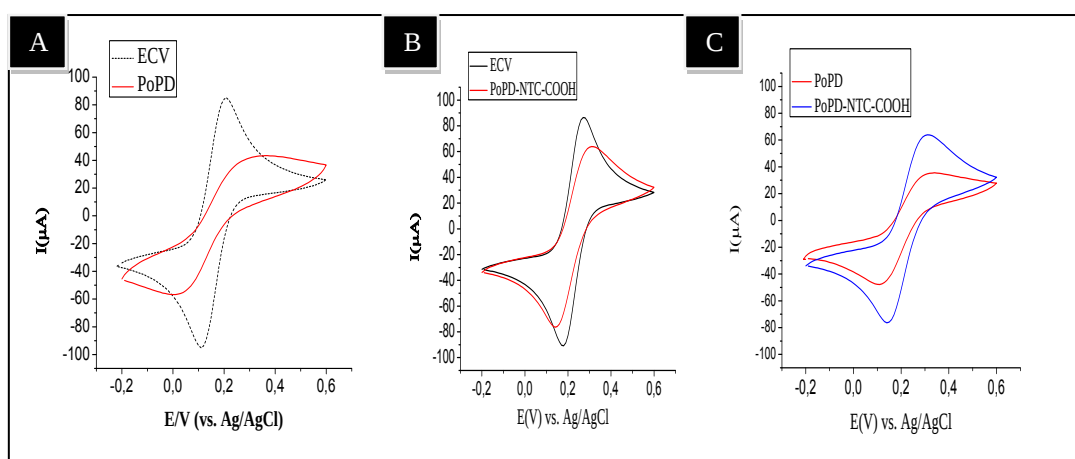


5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO NANOCOMPÓSITO PoPD-NTC

Avaliação da integração dos NTCs ao filme de PoPD foi realizado por técnica eletroquímica. No presente estudo uma solução de NTC (0,2 mg/mL), disperso em DMSO, foi adicionada à solução de monomérica de oPD (15 mM), previamente preparada em H_2SO_4 (100 mM). Os parâmetros ótimos de eletropolimerização estabelecidos na sessão anterior foram, então, utilizados para obtenção do nanocompósito e seu estudo controle (sem NTC).

Comparando-se os resultados obtidos, observou-se um aumento da altura dos picos de corrente de redução e oxidação do ECV modificado com PoPD-NTC (Figura 16b), em relação ao seu estudo controle (Figura 16a). O efeito sinérgico entre o PoPD e NTC resultaram num aumento da condutividade elétrica em cerca de 1,8 vezes em comparação com filme de PoPD (Figura 16c). Este aumento da área eletroativa resultante pelo polímero-CNT pode ser explicado pela facilidade de transferência elétrica, auxiliada pelas hibridizações sp^2 introduzidas pelo nanomaterial. Similar efeito foi observado com nanocompósitos formados por NTC e polipirrol sintetizados conjuntamente.

Figura 16. Voltamogramas cíclicos comparativos do ECV eletropolimerizado apenas com a) oPD e b) com oPD-NTC e em c) Comparação dos perfis eletroquímicos após eletropolimerização. Medidas realizadas em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM) sob velocidade de varredura de 0,05 V/s.

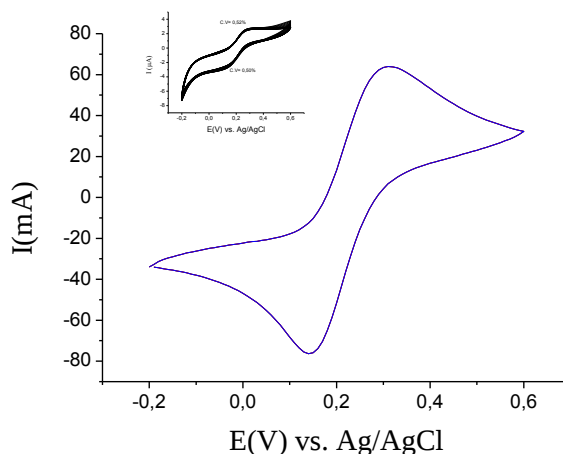


- **Estabilidade do filme nanocompósito Co NTC-COOH**

A estabilidade do nanocompósito de PoPD-NTC foi avaliada submetendo-se o eletrodo a sucessivos 30 ciclos voltamétricos na faixa de potencial -0,2 a 0,6 V, sob velocidade de varredura de 0,05 V/s. Os voltamogramas da Figura 17 exibiram um perfil

praticamente constante em presença 5mM de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM). Foram mensuradas a média, desvio padrão e coeficiente de variação das correntes de pico anódico (I_pA) e corrente de pico catódico (I_pC). A média da I_pA foi 72,85 e da I_pC 75,85, desvio padrão 0,37 e 0,39, respectivamente e coeficientes de variação 0,50% e 0,52%. Os dados mostram o alto grau de estabilidade desse filme polimérico.

Figura 17. Voltamogramas da estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PoPD-NTC quando submetido a 30 sucessivos ciclos. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) sob velocidade de varredura de 0,05 V/s.



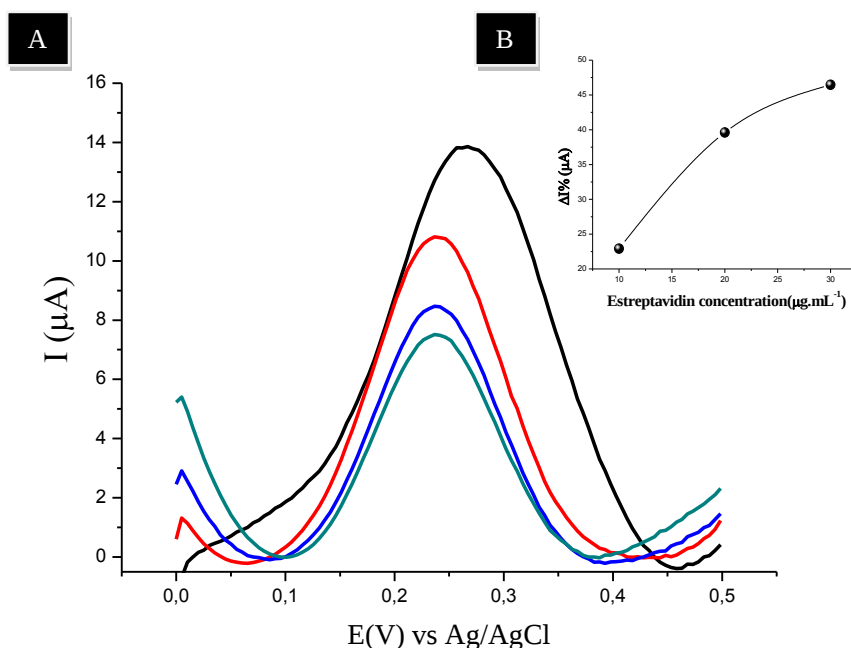
5.3 IMOBILIZAÇÃO DE HCV-BIOT

O antígeno HCV foi imobilizado sobre o filme nanocompósito explorando a estequiometria da interação estreptavidina:biotina (1:4) e sua alta afinidade. Os grupos carboxílicos derivados do NTCs no filme nanocompósito foram ativados com EDC/NHS para imobilização covalente da estreptavidina. Nesta reação, os sítios carboxílicos são ativados formando ésteres amino-reativos. Estes na presença de aminas primárias formam uma ligação amida, permitindo a conjugação covalente de biomoléculas.

Com o objetivo aumentar a sensibilidade do imunossensor com uma maior quantidade de antígenos na superfície sensora, buscou-se a saturar a superfície sensora com a quantidade máxima de estreptavidina, considerando-se que a cada uma molécula, quatro antígenos HCV-biotinilados seriam ligados. Para o estudo, o eletrodo nanoestruturado o filme de PoPD-NTC ativado com EDC/NHS foi submetido à incubações sucessivas com uma concentração fixa de

estreptavidina (10 mM) s durante 60 min. A cada incubação, os eletrodos foram submetidos a análise por VOQ em K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (5 mM) para avaliar o crescimento do filme de avidina. As curvas de SWV da Figura 18 exibindo uma redução de corrente dos picos anódicos com o aumento da concentração de estreptavidina, alcançando um plateau em 30µg/mL. Os valores de variação percentual de corrente ($\Delta I\%$) apresentaram uma concentração ótima de estreptavidina a 30µg/mL, indicando a saturação dos grupos proteína-reativos do nanocompósito (*inset*).

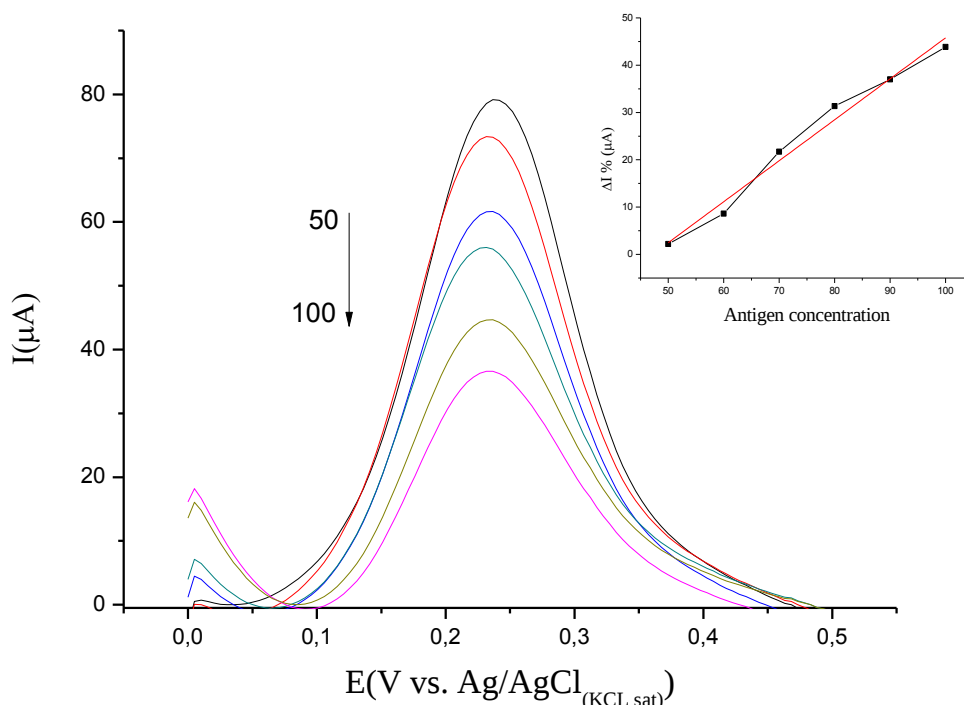
Figura 18. (a) Estudo de concentração da Estreptavidina (10, 20 e 30µg/ml), através da técnica VOQ. Preto: Filme de PoPD/NTC após ativação com EDC/NHS; Vermelho: estreptavidina à 10µg/ml; Azul: estreptavidina à 20µg/ml e Verde: estreptavidina à 30µg/ml. *Inset*: Representação da diferença de corrente dos picos anódicos referente a diferentes concentração de estreptavidina.



Após a conjugação da estreptavidina ao filme de PoPD-NTC, os antígenos biotinilados foram imobilizados. No intuito de se obter concentração ótima de antígenos imobilizados para o equilíbrio antígeno-anticorpo medido (zona de equivalência), inicialmente, uma curva de adição foi realizada com sucessivas incubações do antígeno de HBC-Biot, na concentrações de 10 µg/mL. A Figura 18 exibe os voltamogramas de SWV dos

eletrodos modificados com HCV-Biot. O gráfico inserido com dos valores de concentração de HCV-Biot vs em relação a variação de corrente, embora não indique ainda uma saturação na contração de 100 µg/mL de HCV-Biot, esta concentração foi utilizada por ser cerca de quatro vezes superior à estreptavidina, seguindo no decorrer da montagem da plataforma sensora.

Figura 19. SWVs das sucessivas incubações com HCV-Biot à superfície sensora na concentração de 10 µg/mL. Inset. Plot com a concentração de HCV-Biot vs variação de corrente obtida dos picos anódicos do SWVs.

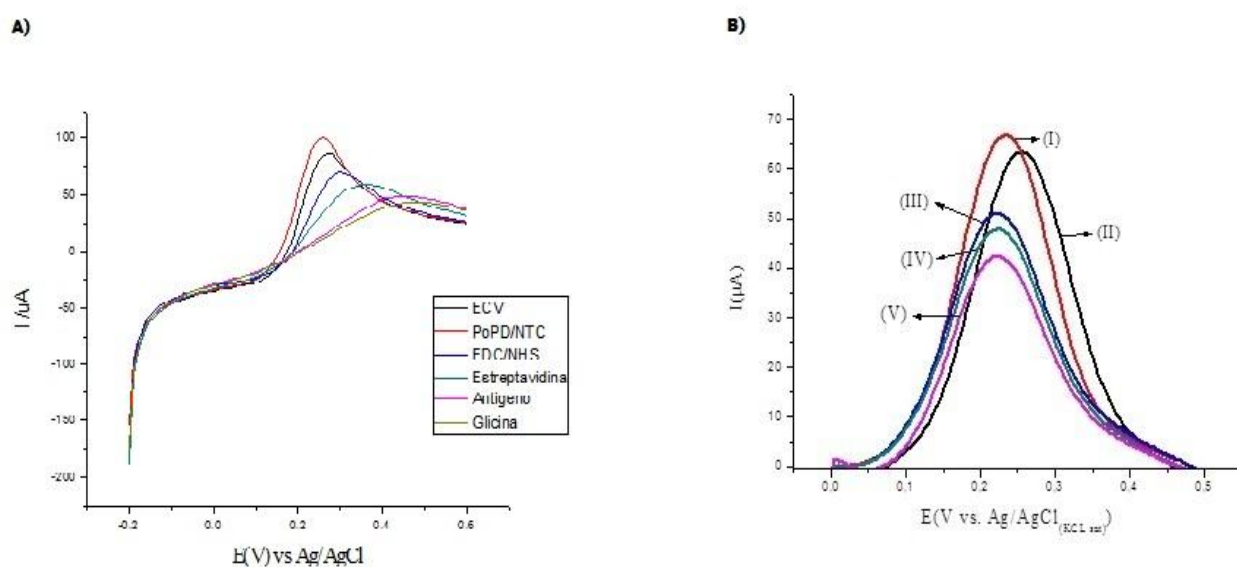


5.4 BLOQUEIO DE LIGAÇÕES NÃO ESPECÍFICAS

Após estabelecida a concentração do antígeno HCV-Biot imobilizado à plataforma sensora, a glicina foi utilizada para bloquear as possíveis reações inespecíficas com outras proteínas da amostra. Após o procedimento do bloqueio observou-se uma redução na corrente elétrica, diminuindo o pico levemente em relação ao antígeno, comprovando que houve o bloqueio da superfície (Figura 19). A presença de sítios amino livres na molécula de glicina proporciona esta ligação, o que se torna importante para evitar ligações amida inespecíficas com o anticorpo ou substâncias presentes na amostra (ZERAVIK *et. al.*, 2010).

Após terem sido estabelecidas as condições ótimas, foi realizado um ensaio confirmatório à luz das técnicas eletroquímicas de voltametria linear (figura 19a) e SWV (figura 19b) a cada uma das etapas de modificações.

Figura 20. Curvas de Voltametria linear e SWVs típicas das sucessivas etapas de modificação da superfície sensora.



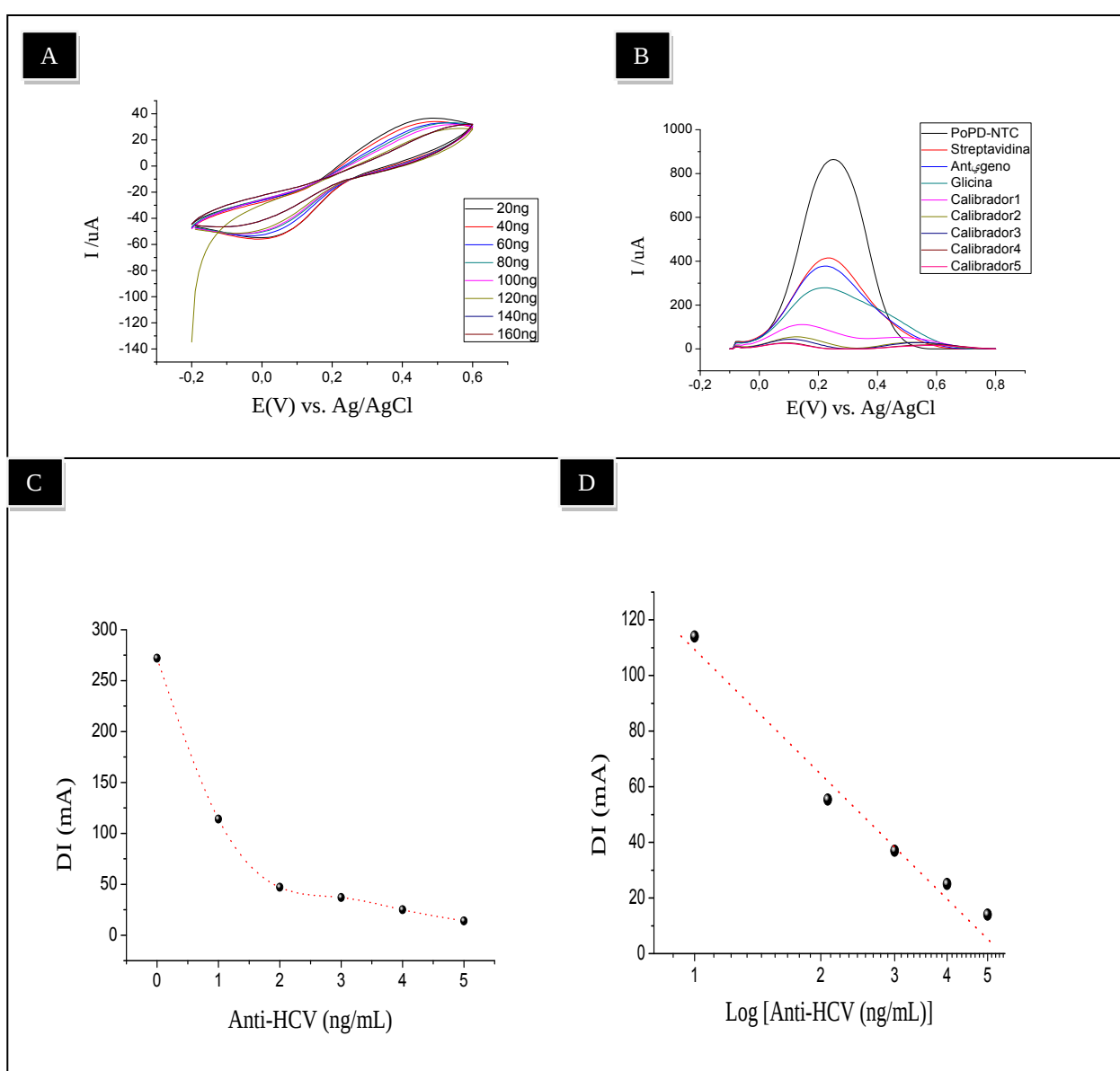
5.5 RESPOSTA ANALÍTICA DO IMUNOSENSOR

Após o preparo da superfície, o sensor foi submetido à validação com amostras de anticorpo anti HCV. A avaliação da resposta sensora foi inicialmente realizada utilizando-se a técnica de VC (Figura 21(a)). Quando o eletrodo foi submetido a padrões de calibradores comerciais empregados em imunoanalisadores contendo uma concentração de 20ng/mL de anti-HCV, realizada por incubações sucessivas por 30 minutos, seguidas por leituras em VC em sonda redox, o perfil voltametrico mostrou redução gradual dos picos redox, consequentemente da área eletroativa, com o aumento no número de incubações sucessivas. Tal decréscimo é justificado pela natureza isolante da biomolécula (MATTOS, 2015, SILVA *et al.*, 2016). Nestas condições, o sensor foi capaz de responder analiticamente às concentrações de anticorpos em níveis similares aos encontrados em laboratórios clínicos.

Para uma resposta mais acurada do imunossensor, optou-se por utilizar-se de uma técnica mais sensível que a VC, sendo usada a SWV. O sensor foi submetido às amostras de

soro enriquecidas com calibrador comercial de anti-HCV. Figura 21(b) exhibe perfil das SWVs das respostas às incubações sucessivas às amostras de 10ng/mL de anti-HCV. De acordo com a Figura 21(c), o sistema mostrou responsivos em amostras de até 50ng/mL. Estes achados foram confirmados através da linearização da curva da figura 21(c) a um escala decimal e logarítmica, indicando que as respostas mantiveram-se lineares com aumento da concentração de anticorpos entre 10 a 50 ng/mL de anti-HCV e com um limite de detecção aproximado de 3,3ng/mL ($n = 6$, $p < 0,01$).

Figura 21. Avaliação da resposta sensora. a) VCs do perfil eletroquímico após incubações sucessivas do anti-HVC sobre o ECV; b) SWVs do perfil eletroquímico em resposta às diferentes concentrações de anti-HCV presentes nas amostras de soro humano enriquecidas obtidas após 30 min de incubação; c) Curva analítica para anit-HCV representativa dos picos de corrente anódicos dos SWVs em relação à concentração de anti-HCV; d) d): Ajuste linear da curva analítica para anit-HCV representativa dos picos de corrente anódicos dos SWVs em relação à logaritmo decimal da concentração de anti-HCV.



6 CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se a parti dos resultados que:

- O efeito sinérgico entre o PoPD e NTC resultaram num aumento da condutividade elétrica em cerca da 1.8 vezes em comparação com filme de PoPD;
- A bioconjugação do nanocompósito à estreptavidina na superfície sensora foi comprovada através dos achados eletroquímicos, permitindo então a imobilização estável de diversas biomoléculas biotiniladas;
- A sensibilidade das técnicas de imobilização aliada ao emprego de NTCs e à seletividade das reações entre o anticorpo e o antígeno resultarão em imunossensores capacitivos mais sensíveis e confiáveis;
- O nanocompósito preparado em uma única etapa sob filme nanoestruturado possibilitará o desenvolvimento de imunossensores para captura de anticorpos, bem como de antígenos circulantes em amostras biológicas.

Esse dispositivo além de preencher os requisitos necessários para determinação de substâncias em baixas concentrações tem como vantagem a detecção em tempo real com baixo custo de produção, comparado aos sistemas ópticos (ressonância de plásmons de superfície) e piezoelétricos. Como consequência, o projeto trará forte contribuição no desenvolvimento de imunossensores envolvendo tecnologia simples e prática, com aplicações principalmente, na área clínica.

Atualmente nenhum imunossensor capacitivo, para diagnóstico da hepatite C, está disponível comercialmente, o que faz desta, uma plataforma promissora; dado a grande versatilidade da tecnologia, novas aplicações podem ser desenvolvidas com a substituição da molécula sensora, assim diferentes aplicações de biossensores poderão ser desenvolvidas com esta mesma nova tecnologia proposta, podendo ser empregados na triagem de doadores sanguíneos, auxiliando a facilitando a logística da coleta.

REFERÊNCIAS

AHUJA, Tarushee et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791-805, 2007.

ATES, Murat. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1853-1859, 2013.

BARSAN, Madalina M.; GHICA, M. Emilia; BRETT, Christopher MA. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review. **Analytica chimica acta**, v. 881, p. 1-23, 2015.

BEHZADI, M.; NOROOZIAN, E.; MIRZAEI, M. A novel coating based on carbon nanotubes/poly-ortho-phenylenediamine composite for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Talanta**, v. 108, p. 66-73, 2013.

BORISOV, Sergey M.; WOLFBEIS, Otto S. Optical biosensors. **Chemical reviews**, v. 108, n. 2, p. 423-461, 2008.

BRANDÃO, Ajacio Bandeira de Mello et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, p. 161-168, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. Brasília, ano V, nº01, V.48, 2017.

CHEN, Ailiang; YANG, Shuming. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. **Biosensors and bioelectronics**, v. 71, p. 230-242, 2015.

CHIBA, K. et al. Electrochemical preparation of a ladder polymer containing phenazine rings. **Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 117-124, 1987.

DE MARTEL, Catherine et al. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, n. 4, p. 1190-1200, 2015.

DELWART, Eric et al. Genetic diversity of recently acquired and prevalent HIV, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections in US blood donors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 875-885, 2012.

DIAS, A.C.M., SILVA, M.M.S., GOMES, S.; **Biosens and Bioelectron**, 44(15) 216–22, 2013.

DUTRA, R. F. ; MENDES, R. K. ; SILVA, V. L.; KUBOTA, L.T. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1744-1750, 2007.

ELSERAG, Hashem B. et al. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 130-137, 2016.

EDMONDS, T. E. **Chemical sensors**. Springer Science & Business Media, 2013.

FOSTER, G. R.; GOLDIN, R. D.; THOMAS, H. C. Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. **Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 209-212, 1998.

GERMER, Jeffrey J. et al. Hepatitis C virus genotypes in clinical specimens tested at a national reference testing laboratory in the United States. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3040-3043, 2011.

HOOFNAGLE, Jay H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, v. 26, n. S3, 1997.

HSU, E. K.; MURRAY, K. F. Hepatitis B and C in children. **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 5, n. 6, p. 311-320, 2008.

HU, Di; PENG, Chuang; CHEN, George Z. Electrodeposition of nonconducting polymers: roles of carbon nanotubes in the process and products. **ACS nano**, v. 4, n. 7, p. 4274-4282, 2010.

HWANG, Joonki; LEE, Sangyeop; CHOO, Jaebum. Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B. **Nanoscale**, v. 8, n. 22, p. 11418-11425, 2016.

KHALED, Elmorsy et al. Performance of a portable biosensor for the analysis of ethion residues. **Talanta**, v. 119, p. 467-472, 2014.

KOHLI, Anita et al. Treatment of hepatitis C: a systematic review. **Jama**, v. 312, n. 6, p. 631-640, 2014.

LAUER, Georg M.; WALKER, Bruce D. Hepatitis C virus infection. **New England Journal of medicine**, v. 345, n. 1, p. 41-52, 2001.

LI, M. J. et al. A hepatitis C electrochemical immunosensor based on thionine covalently bound to self-assembled monolayer. **Chinese journal of Analytical Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 1701-1704, 2005.

LIANG, Mo et al. Sandwich immunoassay for hepatitis C virus non-structural 5A protein using a glassy carbon electrode modified with an Au-MoO₃/chitosan nanocomposite. **Analytical Letters**, v. 46, n. 8, p. 1241-1254, 2013.

LIU, Shaoqin; ZHENG, Zhaozhu; LI, Xinyu. Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 1, p. 63-90, 2013.

LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, p. 79-91, 2006.

LOSITO, Ilario; PALMISANO, Francesco; ZAMBONIN, Pier Giorgio. o-Phenylenediamine electropolymerization by cyclic voltammetry combined with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 4988-4995, 2003.

MA, Cuixia et al. Label-free sandwich type of immunosensor for hepatitis C virus core antigen based on the use of gold nanoparticles on a nanostructured metal oxide surface. **Microchimica Acta**, v. 178, n. 3-4, p. 331-340, 2012.

MA, Cuixia et al. MultisHRP-DNA-coated CMWNTs as signal labels for an ultrasensitive hepatitis C virus core antigen electrochemical immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 467-474, 2013.

MANOS, M. Michele et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes in a diverse US integrated health care population. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 11, p. 1744-1750, 2012.

MARTINUSZ, K.; CZIROK, E.; INZELT, G. Studies of the formation and redox transformation of poly (o-phenylenediamine) films using a quartz crystal microbalance. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 379, n. 1, p. 437-444, 1994.

MARWAHA, Neelam; SACHDEV, Suchet. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 11, p. 2948, 2014.

MENDES, R. K., & Kubota, L. T. Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor, 2006. *Tese de doutorado – Unicamp*.

MERICAN, I. et al. Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 86, n. 2, p. 119-125, 1993.

MESSINA, Jane P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77-87, 2015.

MIRSKY, Vladimir M. (Ed.). **Ultrathin electrochemical chemo-and biosensors: technology and performance**. Springer Science & Business Media, 2013.

MITTAL, Sahil; EL-SERAG, Hashem B. Epidemiology of HCC: consider the population. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 47, p. S2, 2013.

MORAES, Marli L. et al. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. **Langmuir**, v. 29, n. 11, p. 3829-3834, 2013.

MOREIRA, FELISMINA T.C., DUTRA, ROSA .F., **Biosensors & Bioelectronics**. doi:10.1016/j.bios.2011.05.045, 2011.

PAROLO, Claudio et al. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 3, p. 386-390, 2013.

PAWLOTSKY, Jean-Michel. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. **Clinics in liver disease**, v. 7, n. 1, p. 127-137, 2003.

PAWLOTSKY, Jean-Michel; CHEVALIEZ, Stéphane; MCHUTCHISON, John G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1979-1998, 2007.

PAWLOTSKY, Jean-michel et al. Once daily alisporivir interferon (IFN)-free regimens achieve high rates of early HCV clearance in previously untreated patients with HCV genotype (G) 2 or 3. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1433A, 2011.

PAWLOTSKY, Jean-Michel et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2015. **J hepatol**, v. 63, n. 1, p. 199-236, 2015.

PFAENDER, Stephanie et al. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 3, p. e21, 2014.

POENISCH, Marion; BARTENSCHLAGER, Ralf. New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. In: **Seminars in liver disease**. © Thieme Medical Publishers, p. 333-347, 2010.

QIAN, D. et al. Load transfer and deformation mechanisms in carbon nanotube-polystyrene composites. **Applied physics letters**, v. 76, n. 20, p. 2868-2870, 2000.

RAHMAN, Md Mahbubur et al. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4855-4886, 2010.

REZAEI, Behzad; BOROUJENI, Malihe Khalili; ENSAFI, Ali A. Fabrication of DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 66, p. 490-496, 2015.

RICCI, Francesco; ADORNETTO, Gianluca; PALLESCI, Giuseppe. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012.

SAJID, Muhammad; KAWDE, Abdel-Nasser; DAUD, Muhammad. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 689-705, 2015.

SALMINEN, Teppo et al. Anti-HCV immunoassays based on a multiepitope antigen and fluorescent lanthanide chelate reporters. **Journal of virological methods**, v. 228, p. 67-73, 2016.

SASSOLAS, Audrey; BLUM, Loïc J.; LECA-BOUVIER, Béatrice D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SILVA, Bv.M., Cavalcanti, It., Mattos, Ab., Moura, P., Sotomayor, M Pilar T., Dutra, R. F. **Biosensors & Bioelectronics**, v.26, p.1062 - 1067, 2010.

SCHAFF, Zs, Tabor, E., Jackson, D. R., et al.: Ultrastructural alterations in serial liver biopsy specimens from chimpanzees experimentally infected with a human non-A, non-B hepatitis agent. **Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol**, 45(3), 301–312, 1984.

SCHAFF, Z. et al. The pathology of hepatitis C. **Orvosi hetilap**, v. 156, n. 21, p. 836-839, 2015.

SCHEUER, P. J., Ashrafzadeh, P., Sherlock, S., Brown, D. and Dusheiko, G. M. (1992), The pathology of hepatitis C. **Hepatology**, 15: 567–571. doi:10.1002/hep.1840150402.

SHLOMAI, Amir; DE JONG, Ype P.; RICE, Charles M. Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 78-88, 2014.

SHUMYANTSEVA, Victoria V. et al. Electrosynthesis and binding properties of molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine for selective recognition and direct electrochemical detection of myoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 330-336, 2016.

THOMSEN, R. et al. Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. **Medical microbiology and immunology**, v. 181, n. 5, p. 293-300, 1992.

ULIANA, Carolina V.; RICCARDI, Carla S.; YAMANAKA, Hideko. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 42, p. 15476, 2014.

VALVA, Pamela et al. Chronic hepatitis C virus infection: Serum biomarkers in predicting liver damage. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 4, p. 1367, 2016.

VASCONCELOS, E. A ; PERES,N.G. ; OLIVEIRA, C. P. ; SILVA, V. L. ; SILVA JR., E. F. ; DUTRA, R. F. . **Biosensors & Bioelectronics**, v. 010, p. 100, 2009.

VIDOTTI, Marcio et al. Biosensors based on gold nanostructures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2011.

WALKER, Christopher M.; GRAKOU, Arash. Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection?. **Current opinion in immunology**, v. 35, p. 137-143, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet N° 204 – Hepatitis B. Geneva, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Geneva, Switzerland. Fact sheet N° 164 – Hepatitis C, Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Geneva. Weekle Epidemiological Record, N° 6, 77th year, p. 41–48. Geneva, 2002.

YU, Xuekui et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. **Virology**, v. 367, n. 1, p. 126-134, 2007.

YU, Xiaojian et al. An impedance detection circuit for applications in a portable biosensor system. In: **Circuits and Systems (ISCAS), 2016 IEEE International Symposium on**. IEEE,. p. 1518-1521, 2016.