



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIEGO GUERRA DE ALBUQUERQUE CABRAL

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOSSORBIOLÓGICO BASEADO
EM NANOBIOSENSORES PARA DETECÇÃO DA HEPATITE B**

Recife

2018

DIEGO GUERRA DE ALBUQUERQUE CABRAL

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOSSORBIOLÓGICO BASEADO
EM NANOBIOSENSORES PARA DETECÇÃO DA HEPATITE B**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Cabral, Diego Guerreira de Albuquerque
Desenvolvimento de teste imunossorobiológico baseado em nanobiosensores
para detecção da hepatite B / Diego Guerreira de Albuquerque Cabral. – 2018.

176 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Fígado – Doenças. 2. Hepatite B. 3. Fígado – Doenças – Diagnóstico.
I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orientadora). II. Título.

616.3623

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 176

DIEGO GUERRA DE ALBUQUERQUE CABRAL

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOSSORBIOLÓGICO BASEADO
EM NANOBIOSENSORES PARA DETECÇÃO DA HEPATITE B**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 31/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Rosa Amália Fireman Dutra (Orientadora)

Departamento de Engenharia Biomédica – UFPE

Prof^ª. Maria Danielly Lima de Oliveira (1^ª Examinadora)

Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr. Bárbara Virgínia Mendonça da Silva (2^ª Examinadora)

Laboratório de Engenharia Biomédica

Prof^ª. Patricia Maria Guedes Paiva (3^ª Examinadora)

Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^ª. Maria de Mascena Diniz Maia (4^ª Examinadora)

Departamento de Biologia – UFRPE

Dedico ao meu Deus, pois me deu forças para levantar quando tinha desistido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao triúno **Deus** (Pai, Filho e Espírito Santo) porque tem estado comigo e me esperou para formar uma aliança inquebrantável, selada por Seu amor, quando estava em profunda escuridão no meu deserto pessoal; por me ter feito um tesouro particular e conceder propósito de vida ao plantar em meu coração o sonho de Sua missão; por me fazer entender quem eu sou e quem não sou para lutar comigo mesmo quando me torno meu próprio inimigo; por me ensinar a dar cada passo exercendo a fé para vencer meus medos e temores diante de cada montanha rumo à promessa; por Sua imensa graça que me perdoou da culpa e dos meus pecados para me libertar do jugo de escravidão do velho homem, trazendo-me das trevas para a maravilhosa luz; e por me proteger com Sua destra fiel e onipotente quando estou indefeso e vulnerável.

A meus pais, **Maria José e Dário Cabral**, pela minha dignidade e formação com princípios religiosos e morais a ponto de me darem a honestidade intelectual necessária para buscar incessantemente a verdade; por sempre me apoiarem e incentivarem a crescer dando o meu melhor em tudo o que fizesse.

A **Jacilane Bezerra**, por ser resposta de oração e cujos laços de amizade não foram formados por mãos humanas, mas pelas mãos divinas do Criador; porque me ensinou a orar verdadeiramente e entender o sentido da comunicação celestial; por me fazer ouvir corretamente a voz de Deus, instruindo-me no caminho da obediência para ser restaurado à imagem e caráter de Cristo; pelo apoio nos degraus de preparação, nas circunstâncias mais difíceis da minha vida, inclusive deste doutorado; e por me fazer aprender a lutar valentemente cada batalha espiritual travada.

À **Igreja Adventista do Sétimo Dia**, por ter me proporcionado a oportunidade de encontrar, no mistério, esse Deus que mudaria radicalmente a história da minha vida, e ao pequeno grupo **Jóias Preciosas**, pelo carinho, apoio e orações.

Meu profundo agradecimento a minha orientadora, Dr^a **Rosa Dutra**, que também foi instrumento de Deus em minha vida, incentivando-me a continuar o doutorado apesar das dificuldades; por toda orientação concedida e pelo voto de confiança em mim depositado desde o mestrado.

Minha gratidão e reconhecimento ao suporte financeiro recebido por parte da **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco** nos primeiros anos da pesquisa. À Coordenação da pós-graduação e, em especial, a **Adenilda Eugênia**, por ter sido uma benção de Deus imprescindível para subir mais esse degrau.

Às pós-doutorandas, **Blanca Azucena** e **Bárbara Virgínia**, pelo investimento acadêmico no desenvolvimento da pesquisa da tese, **Blanca** pelo suporte inicial e **Bárbara** pelo desfecho.

Agradeço de coração aos meus amigos do LAPED, que me proporcionaram um ambiente de trabalho agradável e se tornaram grandes companheiros. Meu obrigado a **Gilvania Marinete**, **Cybelle Silva**, **Erika Trindade**, **Cecília Prado**, **Paula Burgos**, **Priscila Mendonça**, **Lorena Santos**, **Anne Kelly Santana**, **Gabriel Galdino** e **Tiago Bessa** pela solidariedade, incentivo e ajuda com os experimentos e com o artigo.

Ao coordenador da Virologia do LACEN PE, **João Carlos**, cujo apoio, estímulo e compreensão, tornaram possível a concretização deste doutorado, ao flexibilizar os meus horários.

A **Byron Santos** pela ajuda com a formatação e edição das imagens.

“Mas agora assim diz o Senhor, aquele que te criou, ó Jacó, aquele que te formou, ó Israel: “não temas, pois eu te remi; eu te chamei pelo nome; você é meu.”

Ísaías 43:1

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.”

Ísaías 41:10

RESUMO

A tese aborda o desenvolvimento de um biossensor como um imunensaio eletroquímico dedicado à detecção do vírus da hepatite B (VHB). Além disso, trata-se de divulgar à comunidade científica e acadêmica dois capítulos de livro sobre os avanços mais recentes em relação aos imunossensores aplicados na área de saúde. Este trabalho estabelece uma metodologia que explora um sistema livre de marcação, ou seja, a detecção direta sem a necessidade de anticorpos secundários marcados com espécies redox. Para isso, uma plataforma sensora com superfície nanoestruturada foi utilizada para determinação do anti-HBc, um importante soromarcador de infecção pelo VHB no contexto da saúde pública. A interface eletródica foi estavelmente modificada com nanotubos de carbono de múltiplas paredes e polipirrol para imobilização do antígeno viral HBcAg. Um método versátil e alternativo denominado de polimerização em fase a vapor foi empregado com grande potencial de aplicação industrial devido à facilidade de síntese de uma matriz de estabilização polimérica uniforme e altamente condutiva. O sinergismo entre esse material e o polímero condutor aumentou a condutividade do sistema em 340%. A resposta analítica do imunossensor apresentou uma faixa linear entre 1,25 e 7,5 ng/mL de anti-HBc, com um bom coeficiente de variação ($r = 0,977$) e um limite de detecção de 0,77 ng/mL. Esses resultados demonstram ser relevantes para um futuro teste comercialmente disponível que auxilie na investigação precoce da Hepatite B em larga escala, estimando a prevalência populacional, especialmente em locais mais descentralizados. Ainda, através do levantamento atualizado da literatura científica para a redação da tese foi possível colaborar em seções de livros nos periódicos da IntechOpen e Springer. No primeiro, grande enfoque é dado sobre a importância fornecida pela nanotecnologia, discutindo os aspectos de diferentes nanomateriais à base de carbono envolvidos na elaboração de biossensores eletroquímicos como dispositivos rápidos e portáteis em testes para o pronto atendimento de diagnósticos em saúde. No segundo, uma comparação é realizada sobre o impacto exercido pelos eletrodos impressos nos imunossensores em relação aos testes imunocromatográficos de fluxo lateral. Além de ter concedido um aprofundamento sobre as principais nanopartículas metálicas utilizadas na área, também foi analisado sobre a nova tendência de unir o campo da microfluídica com o biossensoriamento. Entretanto, pondera-se que mais estudos desafiadores envolvendo as ciências dos nanomateriais, biomedicina e engenharia eletrônica devam ser conduzidos futuramente na tentativa de alcançar dispositivos ainda mais rápidos, práticos e confiáveis.

Palavras-chaves: Imunossensores. Nanomateriais. Nanotubos de carbono. Polímeros condutores. Polipirrol. Vírus da hepatite B. Anti-HBc.

ABSTRACT

The doctoral thesis deals the development of a biosensor as an electrochemical immunoassay dedicated to the detection of hepatitis B virus (HBV). It is a question of disseminating to the scientific and academic community two book chapters on the most recent advances in the field of immunosensors applied in the health area. This work establishes a methodology that exploits a label-free system, that is, the direct detection without the need for secondary antibodies labelled with redox species. For this, a nanostructured surface sensing platform was used to determine the anti-HBc, an important seromarker of HBV infection in the context of public health. The electrode interface was stably modified with multi-wall carbon nanotubes and polypyrrole for immobilization of the viral antigen HBcAg. A versatile and alternative method known as vapor phase polymerization was employed with great potential for industrial application due to the ease of synthesis of a uniform and highly conductive polymeric stabilization matrix. The synergism between this nanomaterial and the conducting polymer increased the conductivity of the system by 340%. The analytical response of the immunosensor presented a linear range between 1.25 e 7.5 ng/mL of Anti-HBc, with a good correlation coefficient ($r= 0.977$) and a detection limit of 0.77 ng.mL. These results prove to be relevant to a future commercially available test that assists in the early investigation of hepatitis B on a large scale, estimating population prevalence, especially in more decentralized regions. Also, through an updated survey of the scientific literature for the writing of the doctoral thesis, it was possible to collaborate in sections of books in the periodicals of IntechOpen and Springer. In the first, a great focus is given on the importance provided by nanotechnology, discussing the aspects of different carbon nanomaterials involved in the elaboration of electrochemical biosensors as fast and portable devices in point of care tests of health diagnostics. In the second, a comparison is made on the impact exerted by screen printed electrodes on the immunosensors in relation to lateral flow immunochromatographic tests. In addition to having given a deepening on the main metallic nanoparticles used, it was also analyzed about the new tendency of joining the field of microfluidics with biosensing. However, it has been suggested that more challenging studies involving the nanomaterials, biomedicine and electronics engineering should be conducted in the future in an effort to reach even faster, more practical and more reliable devices.

Keywords: Immunosensors. Nanomaterials. Carbon nanotubes. Conducting polymers. Polypyrrole. Hepatitis B virus. Anti-HBc.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Prevalência global da infecção crônica da hepatite B no ano de 2015.	32
Figura 2 -	Distribuição geográfica da infecção crônica da hepatite B em adultos de 19 a 49 anos.	30
Figura 3 -	Dendogramas pelo método de <i>neighbour-joining</i> representando os genótipos e subtipos do VHB	33
Figura 4 -	Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico no Brasil de 2000 a 2016.	35
Figura 5 -	Imagens de microscopia eletrônica por coloração negativa e números respectivos de partículas do VHB em 1 mL de soro de um de portador crônico em período de viremia.	38
Figura 6 -	Modelo do vírus da hepatite B, originalmente denominado de partícula de Dane, e as partículas filamentosas ou esféricas.	39
Figura 7 -	Heterogeneidade antigênica do HBsAg. Algoritmo para determinar os subtipos do VHB a partir da variabilidade residente na estrutura primária da proteína do gene S	40
Figura 8 -	Representação esquemática da organização genômica do VHB.	39
Figura 9 -	Diagrama de entrada do vírus.	43
Figura 10 -	Determinantes de infectividade e estrutura de seus domínios proteicos.	44
Figura 11 -	Ciclo de vida do VHB	46
Figura 12 -	Subelementos funcionais da estrutura ϵ . A saliência central e a alça apical são determinantes estabelecidos para sua funcionalidade. As sequência apical em vermelho indica um hexaloop clássico do VHB	47
Quadro 1 -	Esquema resumido das possíveis evoluções clínicas da Hepatite B	49
Figura 13 -	Resposta imune celular contra o VHB.	48
Figura 14 -	Curso sorológico da Hepatite B aguda.	53
Figura 15 -	Curso sorológico da Hepatite B crônica.	54
Figura 16 -	Exemplos de TLR para ensaios imunocromatográficos: (1a) imunocromatografia de fluxo lateral; (1b) imunocromatografia de dupla migração – DPP; (1c) imunoconcentração; (1d) fase sólida.	59
Figura 17 -	Representação esquemática da estrutura típica de um biossensor.	61
Figura 18 -	Esquema representativo e a própria estrutura molecular da	

	imunoglobulina G.....	63
Figura 19 -	Sistema eletroquímico conectado ao potenciostato (d) constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (Ag/AgCl) (a) e um eletrodo auxiliar (fio de platina) (c).	63
Figura 20 -	Parâmetros obtidos de um VC: potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa}), correntes de picos catódicos e anódicos (I_{pc} e I_{pa}).	64
Figura 21 -	Limpeza eletroquímica por polimento mecânico.....	69
Figura 22 -	Representação esquemática dos principais métodos de imobilização na construção de imunossensores.	71
Figura 23 -	Grafeno, na parte superior, e as estruturas relacionadas: fulereno (canto inferior esquerdo); nanotubos de carbono (centro inferior); e grafite (canto inferior direito).	74
Figura 24 -	Classificação dos nanotubos de carbono (parte superior). Representação esquemática dos três tipos de nanotubo de parede única (parte inferior): (a) Poltrona, (b) Quiral e (c) Ziguezague.	78
Figura 25 -	Lado esquerdo: representação da estrutura química dos principais polímeros condutores utilizados na fabricação de imunossensores. Lado direito: estrutura com ligações duplas alternadas do pirrol e caminho de condução eletrônica no polipirrol.....	79
Figura 26 -	Processo de eletropolimerização do polipirrol.....	84
Figura 27 -	Polimerização química do pirrol utilizando o cloreto férrico como agente oxidante.	86
Figura 28 -	Estrutura química do monômero e do polímero polipirrol. Esquema de uma câmara de polimerização em fase a vapor.	87
Figura 29 -	Schematic illustration of the stepwise preparation of the immunosensor: (a) COOH–CNTs–FeCl ₂ /PPy film formation via VPP and (b), the principle of the electrochemical immunoassay with the successive electrodic modifications	93
Figura 30 -	(A) Voltammetric profile of the GCE comparing the polymerization method of obtain of the COOH–CNT/PPy nanocomposite film: (I) bare electrode, (II) VPP method and (III) electrochemical method. Measures performed in K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0.005 mol L ⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L ⁻¹), at 50 mV s ⁻¹ scan rate. (B) The increase in the electroactive area of the nanofilms	95

Figura 31 -	Stability of the COOH–CNT-FeCl ₂ /PPy film when submitted to 20 successive voltammetric cycles. Measures performed in K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0.005 mol L ⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L ⁻¹) at scan rate of 50 mV s ⁻¹	96
Figura 32 -	Above: CVs of the stepwise of the assembly procedure of the immunosensor: (I) bare GCE , (II) COOH-CNT-FeCl ₂ /PPY/GCE; (III) HBcAg/COOH-CNT-FeCl ₂ /PPY/GCE and (IV) Glycine/HBcAg/COOH-CNT-FeCl ₂ /PPY/GCE. Voltammograms were obtained in an K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ solution (0.005 mol L ⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L ⁻¹). Below: AFM micrographs comparing different steps of assembling of the nanocomposite film: (I) bare GCE; (a) GCE/COOH-CNT-FeCl ₂ ; (II) GCE/COOH-CNT-FeCl ₂ /PPy.....	97
Figura 33 -	CVs of the GCE/COOH–CNT-FeCl ₂ /PPy under different scan rates (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 mV s ⁻¹). Measures performed in K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0,005 mol L ⁻¹) prepared in KCl (0,1 mol L ⁻¹); (Insert)Graph of the I _{pa} and I _{pc} versus square root of the scan rates.....	98
Figura 34 -	Analytical responses at different concentrations of anti-HBc obtained in K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (5 mM) prepared emKCl (0,1 M) as electrochemical probe: (A) blank (HBcAg), b–e represent the curves of 1-4 ng.mL ⁻¹ of anti-HBc. (B) Fit of relationship between ΔI and anti-HBc concentrations (presence and absence) in serological samples	99
Figura 35 -	Selectivity test of electrochemical immunosensor toward some antibodies target of real samples of viral hepatitis	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Outros tipos de técnicas voltamétricas. Os pontos indicam o momento em que a corrente é medida. A resposta de corrente é para a redução de um par redox reversível.....	68
Tabela 2 -	Principais características das diferentes técnicas de imobilização.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato de ribose, do inglês, <i>Adenosine diphosphate</i>
AgAu	Antígeno Austrália
AIDS	Síndrome da Deficiência Adquirida, do inglês, <i>Acquired</i>
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do core da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno e da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B
ASHV	Vírus da hepatite do esquilo do ártico, do inglês, <i>Arctic squirrel</i>
cccDNA	DNA circular covalentemente fechado, do inglês, <i>Covalently closed circular DNA</i>
CCDs	Dispositivo de carga acoplada, do inglês, <i>Charge-coupled device</i>
CD4	Grupamento de diferenciação 4, do inglês, <i>cluster of differentiation 4</i>
CD8	Grupamento de diferenciação 8, do inglês, <i>cluster of differentiation 8</i>
CH	Cadeia pesada, do inglês, <i>Heavy chain</i>
CHBV	Genótipos do vírus da hepatite B, do inglês, <i>Hepatitis B virus</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças e problemas relacionados
CL	Cadeia leve, do inglês, <i>Light chain</i>
CMIA	Imunoensaio com micropartículas de quimioluminescência, do inglês, <i>Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay</i>
CNTs	Nanotubos de carbono, do inglês, <i>Carbono nanotubes</i>
CV	Coefficiente de variação
DC	Domínio constante
DHBV	Vírus da hepatite de pato selvagem, do inglês, <i>Duck hepatitis B virus</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DR	Repetição direta, do inglês, <i>Direct repeat</i>
DV	Domínio variável
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, <i>Ethylenediamine</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent</i>
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
Ipa	Corrente de pico anódico

Ipc	Corrente de pico catódico
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
Fab	Fragmento ligante do antígeno, do inglês, Fragment antigen-binding
HAV	Vírus da hepatite A, do inglês, <i>Hepatitis A Virus</i>
HBcAg	Antígeno do core da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
HBxAg	Antígeno x da hepatite B
VHB	Vírus da hepatite B, do inglês, do inglês, <i>Hepatitis B Virus</i>
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C Virus</i>
HDV	Vírus da hepatite D, do inglês, <i>Hepatitis D Virus</i>
HEV	Vírus da hepatite E, do inglês, <i>Hepatitis E Virus</i>
HHBV	Vírus da hepatite da garça, do inglês, <i>Heron hepatitis B Virus</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês, <i>Human</i>
HMFA	Hexametilfosforamida
GO	Óxido de Grafeno, do inglês, <i>Graphene oxide</i>
GSHV	Vírus da hepatite do esquilo terrestre, do inglês, <i>Ground squirrel</i>
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHAG	Insuficiência hepática aguda grave
ITO	Óxido de índio dopado com estanho
INR	Razão Normalizada Internacional, do inglês, <i>International</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LDR	Resistor dependente de luz, do inglês, <i>Light Dependent Resistor</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP	Polímeros molecularmente impressos
MWCNT	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes, do inglês, <i>Multi-walled carbon nanotube</i>
MS	Ministério da Saúde
NAT	Testes de ácidos nucleicos, do inglês, <i>Nucleic Acid Amplification Test</i>
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NMP	N-metilpirrolidona
NTCP	Polipeptídeo co-transportador de Na ⁺ /taurocolato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde

ORF	Fase aberta de leitura, do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
PANI	Poli(anilina)
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, <i>Polymerase Chain</i>
PEDOT	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
PEI	Instituto Paul Ehrlich
pgRNA	RNA pré-genômico
pH	Potencial Hidrogeniônico
POCT	teste à beira do leito, do inglês, <i>Point-of-care testing</i>
PPy	Polipirrol, do inglês, polypyrrole
PPV	Poli(p-fenileno vinileno)
PTh	Poli(tiofeno)
rcDNA	DNA circular relaxado, do inglês, <i>Relaxed circular DNA</i>
RGO	Óxido de Grafeno Reduzido, do inglês, <i>Reduced graphene oxide</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
SH	Hepatite sérica, do inglês, <i>Serum hepatitis</i>
SGHBV	Vírus da hepatite B do ganso da neve, do inglês, <i>Snow</i>
SI	Sistema de Unidade Internacional
SPR	Ressonância de Plásmos de Superfície
STHBV	Vírus da hepatite B de cegonha, do inglês, <i>Storkhepatitis B virus</i>
SWCNT	Nanotubos de carbon de parede simples, do inglês, <i>Single-walled carbon nanotube</i>
TDP1	Tirosil-DNA-fosfodiesterase 1
TDP2	Tirosil-DNA-fosfodiesterase 2
TOP1	Topoisomerase 1
TOP2	Topoisomerase 2
TR	Teste rápido
TLP	Teste laboratorial portátil
TLR	Teste laboratorial remoto
VC	Voltametria cíclica
Vs	Versus
VHB	Vírus da hepatite B
VH	Domínio variável da cadeia pesada, do inglês, <i>Variable domain</i>
VL	Domínio variável da cadeia leve, do inglês, <i>variable domain light</i>
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferenciada
VPP	Polimerização de fase a vapor, do inglês, <i>Vapour phase</i>
WHV	Vírus da hepatite de marmota, do inglês, <i>Woodchuck hepatitis virus</i>
WMHBV	Vírus da hepatite do macaco do Novo Mundo, <i>Hepadnavirus from</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
Ar	Argônio
β	Beta
C ₂ H ₆ O	Etanol
Cl ⁻	Ânion cloreto
COOH	Grupo funcional carboxila
CO ₂	Dióxido de carbônico
CT	Limiar do ciclo, do inglês, threshold cycle
E	Potencial
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FeCl ₂	Cloreto ferroso (II)
FeCl ₃	Cloreto férrico (III)
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de potássio
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico anidro
Kpb	Kilobases
kDa	KiloDalton
M	Molar
M Ω /cm	Megaohm por centímetro
mL	Mililitro
mV/s	Milivolt por segundo
N	Nitrogênio
N ₂	Gás nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NH ₄	Amônia
NH ₂	Grupo funcional amina
NHS	N-hidroxi succinimida
O ₂	Oxigênio
Ω -	Ohm
pb	Pares de base

PBS	Tampão fosfato salino
Pg	Picograma
S	Siemens
V	Volt
UI	Unidade Internacional
µm	Micrômetro
µl	Micro litro
U-PEI	Unidade do Instituto Paul Ehrlich
°C	Graus célsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS	28
1.1.1	Objetivo geral	28
1.1.2	Objetivos específicos.....	28
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
2.1	HEPATITE B	29
2.1.1	Histórico.....	29
2.1.2	Epidemiologia	31
2.1.3	Transmissão.....	35
2.1.4	Classificação Taxonômica	37
2.1.5	Estrutura Viral.....	37
2.1.6	Organização Genômica	40
2.1.7	Replicação Viral	43
2.1.8	História Natural e Manifestações Clínicas	48
2.1.8.1	Hepatite Aguda.....	49
2.1.8.2	Hepatite Fulminante	50
2.1.8.3	Hepatite Crônica.....	51
2.1.9	Diagnóstico.....	52
2.1.9.1	Ensaio Sorológicos.....	53
2.1.9.1.1	<i>Antígeno de superfície de hepatite B e o respectivo anticorpo.....</i>	<i>53</i>
2.1.9.1.2	<i>Antígeno do nucleocapsídeo vírico da Hepatite B e o respectivo anticorpo..</i>	<i>55</i>
2.1.9.1.3	<i>Antígeno e da Hepatite B e o respectivo anticorpo.....</i>	<i>56</i>
2.1.9.2	Ensaio moleculares do VHB-DNA sérico.....	57
2.1.9.3	Testes laboratoriais remotos	58
2.2	BIOSSENSORES.....	60
2.2.1	Imunossensores.....	62
2.2.2	Técnicas eletroquímicas	64
2.2.2.1	Voltametria cíclica	65
2.2.2.2	Voltametria de onda quadrada	67

2.2.2.3	Voltametria de pulso diferencial	67
2.2.3	Seleção eletródica e limpeza eletroquímica	68
2.2.4	Modificação da superfície eletródica	69
2.2.5	Métodos de imobilização	70
2.2.6	Nanomateriais.....	73
2.2.6.1	Nanopartículas metálicas	73
2.2.6.1.1	<i>Nanopartículas de ouro</i>	74
2.2.6.1.2	<i>Nanopartículas de prata.....</i>	74
2.2.6.1.3	<i>Nanopartículas magnéticas</i>	74
2.2.6.2	Alótropos de carbono.....	75
2.2.6.2.1	<i>Grafeno.....</i>	75
2.2.6.2.	<i>Nanotubos de carbono.....</i>	77
2.2.6.3	Polímeros condutores	80
2.2.6.3.1	<i>Nanocompósitos</i>	83
2.2.6.3.2	<i>Polipirrol</i>	83
3	RESULTADOS.....	89
3.2	IMMUNOSENSOR BASED ON POLYPYRROLE-CNT VAPOUR PHASE POLYMERIZATION FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS.....	89
4	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A - CAPÍTULO PUBLICADO NO PERIÓDICO INTECHOPEN	127
	APÊNDICE B - CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO ADVANCES IN BIOSENSORS: REVIEWS.....	156

1 INTRODUÇÃO

A hepatite B, em pleno século XXI, ainda representa um enorme problema por ser uma grave viremia crônica. Embora 257 milhões de pessoas saibam que têm a hepatite B, a maioria dos portadores não está previamente consciente de sua situação clínica. Como a doença cursa sorrateiramente para a cronificação, isso tem impedido o tratamento precoce, resultando em 887.000 mortes (WHO, 2017). Por conta disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, elaborou um documento que visa ao estabelecimento de estratégias globais capazes de atingir a meta de eliminação das hepatites virais como uma ameaça de saúde pública até 2030, reduzindo os novos casos em 90% e em 65% a mortalidade a elas associada (WHO, 2016a). Em março de 2017, 43 países informaram à OMS que haviam formulado planos nacionais de eliminação das hepatites virais e outros 36 Estados membros relataram que estavam no processo de desenvolvimento de seus próprios planos (WHO, 2017b).

Tendo em vista que a maioria das pessoas que vivem com hepatite B são assintomáticas e sua cronicidade passa despercebida, a vigilância epidemiológica tem por dever captar o máximo de estatísticas para monitoramento de três aspectos: a hepatite aguda, as infecções crônicas e as mortalidades. O Brasil, como signatário do documento supracitado, tem desde então estabelecido linhas de ação, visando ao alcance das metas em nível nacional. Por isso, estimar a prevalência de infecção crônica na população geral por meio de pesquisa de biomarcadores é fundamental para uma avaliação mais detalhada do país. Pesquisas que coletam e testam amostras de sangue são necessárias para estimar o número de pessoas infectadas e as informações obtidas por levantamentos soropidemiológicos são relevantes para subsidiar a formulação ou reorientação de políticas públicas (WHO, 2016b).

O diagnóstico é a abordagem inicial de combate. Para se conseguir uma descoberta precoce, a investigação do anticorpo anti-HBc é um pré-requisito, pois é um dos marcadores sorológicos que logo aparecem no curso infeccioso. Persiste praticamente ao longo da vida e pode ser o único detectável no caso da hepatite B oculta. Por essa razão, tem sido usado na triagem de bolsas de sangue em todo o mundo para reduzir o risco de transmissão pós-transfusional (SEO et al., 2015; ESPOSITO et al., 2017). O controle da infecção é uma tarefa desafiadora, principalmente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, onde existe acesso limitado ao diagnóstico devido à insuficiência de infraestrutura de saúde. Uma triagem universal pode identificar indivíduos suscetíveis

concedendo a oportunidade de vaciná-los antes do desenvolvimento de doença hepática avançada, além de distinguir os portadores crônicos para conduzi-los ao tratamento antiviral (YILDIZ et al., 2015; EASTERBROOK et al., 2017). Infelizmente, os altos custos e a falta de recursos para montar estratégias baseadas em ensaios sorológicos e moleculares restringem qualquer aplicação em larga escala (PEELING et al., 2017).

Os métodos atualmente utilizados para realizar o diagnóstico imunológico da hepatite B são: ensaio imunoenzimático, imunoensaio quimioluminescente, imunoensaio eletroquimioluminescente e os ensaios imunocromatográficos. Os primeiros são testes clássicos que apresentam maior complexidade operacional. Para esses testes convencionais, minimizar o custo de todo o processo de detecção ainda é um passo desafiador, pois requer profissionais qualificados, organização adequada do laboratório e instrumentos automatizados, modernos e sofisticados. O último refere-se a um método de detecção de baixo custo que pode ser utilizado como teste laboratorial remoto (VILLAR et al., 2015; HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014).

Avanços na tecnologia de detecção rápida criaram novas oportunidades de melhoramentos. Os testes de pronto atendimento diminuíram consideravelmente os erros de fase pré-analítica ao dispensar o transporte de amostras. Eles podem ser facilmente usados em qualquer lugar, envolvendo apenas pequenos volumes de amostra com pouco ou nenhum suprimento externo de energia. Devido à sua simplicidade de manuseio e facilidade de interpretação, liberam rapidamente seus resultados (GUBALA et al., 2012). Também são considerados uma solução poderosa para atender aos requisitos de descentralização diagnóstica. Embora tenha havido grande perspectiva nos últimos anos, poucos dispositivos para atenção ao público da hepatite B chegaram ao mercado (DUCHESNE; LACOMBE, 2018).

No intuito de desenvolver novas tecnologias para a investigação do VHB, os imunossensores surgem como importantes sistemas analíticos. Esses dispositivos são compostos por duas partes, uma biológica, formada pelo imunorreceptor (antígeno ou anticorpo) e outra eletrônica (transdutor), que, em conjunto, são capazes de detectar analitos quali ou quantitativamente. Dependendo do método de transdução de sinal da reação imunológica, os imunossensores podem ser classificados em: eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, capacitivos e impedimétricos), ópticos (por ressonância de plásmons de superfície (SPR) e fluorescência) e piezelétricos (RICCI et al., 2007). Em particular, os imunossensores eletroquímicos têm se destacado, devido a sua alta sensibilidade, baixo custo quando comparado aos demais transdutores e compatibilidade

com as tecnologias de miniaturização (LI; YANG; LI, 2011; QIU et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Recentemente, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos livres de marcação com o objetivo de desenvolver ensaios mais simples e rápidos, pois estes dispensam o uso de anticorpos ou antígenos conjugados à enzimas (MULCHANDANI; MYUNG, 2011). Nestes sistemas, medidas de corrente, potencial, capacitância e condutância são monitoradas em tempo real para a reação antígeno-anticorpo (PIAO et al., 2008). Dentre estes métodos, os imunossensores capacitivos têm se destacado como atrativos e apresentam limites de detecção na ordem de fentogramas por mililitro (PINGARRÓN; YÁÑEZ-SEDEÑO; GONZÁLEZ-CORTÉS, 2008).

Considerando a imobilização como outra etapa fundamental, diferentes metodologias podem ser empregadas visando à fixação do anticorpo de modo irreversível à base sensora. A investigação e uso de novos nanomateriais permite aumentar a área eletroativa e a quantidade de material imobilizado, resultando numa maior sensibilidade destes dispositivos. Diversos tipos de nanomateriais têm sido empregados em imunossensores, tais como nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas, pontos quânticos, silícios porosos e nanotubos de carbono (KANG et al., 2007).

Dentre os nanomateriais citados, os nanotubos de carbono (NTCs) têm recebido significativa atenção, devido as suas excelentes propriedades elétricas, químicas e mecânicas (LU et al., 2009). Estruturalmente, os nanotubos são compostos de átomos de carbono em uma folha de grafeno enrolada, formando um cilindro. Esses materiais podem ser constituídos por uma única folha de grafeno, referido como NTCs de parede única (SWCNT, do inglês “single walled carbon nanotube”), ou múltiplas camadas concêntricas de grafeno, formando estruturas conhecidas como NTCs de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês “multi walled carbon nanotube”) (MÉNARD-MOYON et al., 2010). Os MWCNTs atendem às principais características de um material para o desenvolvimento de sensores, pois conferem aos mesmos uma eficiente cinética de transferência de elétrons e alta relação área/volume além de envolver menores custos de produção (LU et al., 2009). A modificação de NTCs com diferentes grupos funcionais (carboxi e amino) permitem a ancoragem de diversos tipos de biomoléculas, podendo ser projetada para preservar os sítios de ligação livres para reconhecimento de epítomos.

A associação entre matrizes poliméricas e NTCs para construção de plataformas sensoras nanoestruturadas tem gerado novas possibilidades para exploração de superfícies

eletródicas com acentuadas propriedades mecânicas e elétricas (ATES; SARAC, 2009). Dentre os polímeros condutores, o polipirrol (PPy) é uma referência para elaboração de plataformas sensoras estáveis (AMOUZADEH TABRIZI; SHAMSIPUR; MOSTAFAIE, 2016). O monômero de pirrol caracteriza-se por ser um composto heterocíclico aromático, extremamente reativo devido à alta densidade eletrônica no anel. Através da protonação nos átomos de carbono do anel aromático, cátions são gerados e estes formam oligômeros que permitem a polimerização, e conseqüente formação da matriz (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

A polimerização em fase de vapor (VPP) é uma técnica de síntese em larga escala, versátil e simples, fornecendo uma rota favorável para a produção econômica de filmes uniformes e homogêneos de polímeros e seus respectivos nanocompósitos. Este processo apresenta as vantagens de não ter incompatibilidade com solventes, não depender de energia externa e nem requerer instrumentação especial: potenciostato acoplado a célula eletroquímica. Uma película condutora pode ser gerada pela exposição da superfície eletródica revestida com oxidantes químicos à vaporização do pirrol, cobrindo todo o substrato sólido pela matriz polimérica. A polimerização ocorre dentro de uma câmara hermética para limitar o contato com o ar. Esta deposição química é de grande interesse industrial devido à facilidade de processamento; por não se restringir apenas a substratos condutores, tornando possível utilizar esse recurso para cobrir diretamente outros materiais; e pela grande viabilidade para controlar o peso molecular e as características estruturais do pirrol (BHATTACHARYYA et al., 2012; BROOKE et al., 2017).

Nos últimos anos, os biossensores têm se revelado como um dos melhores dispositivos portáteis de diagnóstico rápido, preciso e econômico para determinação de metabólicos em fluidos biológicos quando comparados com outros sistemas, tais como autoanalisadores químicos (WANG et al., 2016). Atualmente a tecnologia de eletrodos impressos (“*screen printed*”) aliada ao emprego de nanomateriais, pois oferecem uma maior superfície ativa, vem abrindo perspectivas para a construção de sensores do tipo “point-of-care” ultrasensíveis que permitem quantificar anticorpos e outras moléculas biológicas, mesmo em faixas de concentração muito baixas. Facilmente podem ser produzidos em larga escala na forma de “*tips*”. Esses *tips* sensores consistem na impressão de um homogenato constituído por tintas metálicas (eletrodos impressos de ouro) ou de carbono (eletrodos impressos de carbono) sobre um suporte rígido (cerâmico ou plástico) (WANG et al., 2008). Em geral, esses sensores são tri-eletródicos com eletrodos de referência, auxiliar e trabalho integrados em um único suporte. Devido às características intrínsecas de elevada sensibilidade e baixo custo de

produção, estes dispositivos são eleitos como adequados para testes de rastreamento em campanhas de saúde de grande abrangência ou outros serviços que requeiram uma rápida resposta sorológica.

De fato, um biossensor de múltiplas detecções para soromarcadores chave para a hepatite B é capaz de fornecer as valiosas estimativas para avaliar o impacto das políticas e programas nacionais de forma mais prática e econômica. Ainda, o desenvolvimento deste protótipo pode um dia ser utilizado na pré-triagem do VHB em doadores, promovendo a segurança transfusional e controle da disseminação viral o que poderia resultar em um grande impacto nos custos relativos à produção de bolsas de sangue.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver uma plataforma sensora utilizando filmes nanoestruturados para o diagnóstico sorológico da hepatite B e promover um aprofundamento sistemático acerca dos principais avanços nanotecnológicos aplicados aos imunossensores na área de saúde.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um estudo sobre as propriedades e contribuições dos nanomateriais, sobretudo aqueles à base de carbono, para aplicação na área de biosensores;
- Realizar um levantamento e traçar um comparativo a respeito dos testes “*point-of-care*”;
- Estabelecer um método de dispersão dos MWCNTs;
- Sintetizar filmes finos nanoestruturados de MWCNT e polipirrol em substratos de carbono vítreo;
- Imobilizar covalentemente antígenos HBcAg na plataforma sensora;
- Realizar análises por técnicas eletroquímicas e microscopia de força atômica para caracterizar a superfície nanoestruturada;
- Estabelecer uma curva de calibração para determinação do Anti-HBc em amostra comercial padrão e em soros infectados;
- Caracterizar o sistema de imunossensoriamento proposto quanto a sua sensibilidade e especificidade de suas respostas analíticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HEPATITE B

A hepatite é uma afecção inflamatória do fígado tanto por etiologias infecciosas (virais, parasitárias, bacterianas) como por causas não infecciosas (medicamentos, substâncias químicas hepatotóxicas, álcool, doenças autoimunes, metabólicas e genéticas) (BRASIL, 2009). As hepatites virais são ocasionadas por cinco vírus: o vírus da hepatite A (HAV, do inglês “*hepatitis A virus*”), o vírus da hepatite B (HBV, do inglês “*hepatitis B virus*”), o vírus da hepatite C (HCV, do inglês “*hepatitis C virus*”), o vírus da hepatite D (HDV, do inglês “*hepatitis D virus*”) e o vírus da hepatite E (HEV, do inglês “*hepatitis E virus*”) (WONG et al., 2015). A hepatite B é provocada por um tipo de vírus que possui tropismo primário pelo tecido hepático apresentando características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais semelhantes aos outros agentes virais. Tem grande importância para a saúde pública em virtude do número de indivíduos acometidos e das complicações resultantes das formas aguda (Classificação Internacional de Doenças - CID 10: B16.2 e B16.9) e crônica da infecção (CID 10: B18.1) (BRASIL, 2009).

2.1.1 Histórico

Ao realizar uma retrospectiva, constatou-se que o termo hepatite foi introduzido pela primeira vez no século XVIII por Bianchi, na publicação intitulada *Historia hepatica sem Thoria et práxis omnius morborum hepatitis et bilis*, em 1725 (REUBEN, 2003). No entanto, em 1883 a 1884, houve provavelmente o primeiro relato documentado cientificamente da existência de uma forma de hepatite transmitida pela inoculação parenteral em escala epidêmica. Na ocasião, Lürmen descreveu na Alemanha que de um total de 1.289 indivíduos de um estaleiro naval do porto de Bremen que receberam vacina contra varíola, preparada a partir de linfa humana, 191 trabalhadores foram acometidos por um quadro icterício de um a sete meses após a aplicação vacinal. O mesmo não ocorreu entre aqueles que não foram vacinados. A doença manifestava-se, além da icterícia, com fadiga, anorexia, complicações digestivas e, por vezes, com intenso prurido cutâneo. Em virtude da natureza contagiosa e período de incubação, ficou suspeito que uma entidade viral estaria por trás envolvido (WONG et al., 2015).

Em 1922, com o advento da insulina injetável para tratamento de diabetes, novos casos de icterícia foram reconhecidamente associados ao uso de seringas reutilizáveis e agulhas não estéreis, numa época em que a rotina de descarte de materiais perfurocortantes não era prática comum (FLAUM et al., 2009). Durante a Segunda Guerra Mundial, mais epidemias de icterícia foram relatadas após a vacinação contra febre amarela. No Brasil, o surto foi observado no Estado do Espírito Santo em 1940, onde dois lotes de vacina estabilizada pela adição de soro humano foram apontados como fonte de infecção (FONSECA, 2010). E da mesma maneira, em 1942, no corpo do exército dos Estados Unidos, cerca de 50.000 soldados adoeceram em seguida à administração de lotes específicos da vacina, o que resultou em 62 óbitos (WONG et al., 2015). Estudos posteriores confirmaram que os militares americanos tinham contraído a hepatite viral do tipo B (SEEFF et al., 1987).

A primeira transmissão voluntária da hepatite infecciosa aconteceu também em 1942 quando o

médico austríaco Voegt e três alunos de medicina da Universidade de Viena ingeriram intencionalmente suco duodenal de um paciente doente. Após três a quatro semanas, os quatro voluntários apresentaram sinais e sintomas característicos de hepatite aguda, confirmando assim o contágio direto por um agente transmissor (WONG et al., 2015; FONSECA, 2010). No passado, trabalhos realizados por experimentação voluntária forneceram subsídios científicos que consolidaram importantes linhas de investigação, embora fugissem totalmente dos padrões éticos modernos de pesquisa. Já o primeiro caso de hepatite relacionado à transmissão de componentes hemoterápicos foi mencionado em 1943 por Beeson (BEESON, 1943).

Precisamente, em 1965, o pesquisador geneticista Baruch Blumberg e outros colaboradores, ao trabalharem com experiências de imunodifusão em gel a fim de identificar e rastrear diferenças genéticas em populações humanas. Era um estudo em soros de indivíduos com múltiplas transfusões prévias de sangue como fontes de anticorpos para proteínas séricas humanas e descobriram acidentalmente que o soro de um hemofílico reagia com um antígeno presente no soro de um aborígine australiano formando uma linha de precipitação (BLUMBERG; ALTER, 1965). Posteriormente, o desenvolvimento de hepatite aguda numa investigadora do mesmo laboratório após contato com material contaminado forneceu o elo inicial com esse antígeno e a patologia hepática, a qual, na época, foi atribuído o nome de antígeno Austrália (AgAu) (BLUMBERG et al., 1967). A descoberta ocasional foi apenas reconhecida no ano de 1976, recebendo o prêmio Nobel de medicina e fisiologia; e somente tal marco abriu caminho para o descobrimento dos outros tipos de hepatites virais.

Independentemente do fato acima, em 1968, Prince, nos Estados Unidos, isolou outro antígeno no sangue durante o período de incubação de uma hepatite pós-transfusional (PRINCE, 1968). O referido antígeno foi denominado de antígeno SH, relativo à hepatite sérica. Mais tarde, comprovou-se que o antígeno SH era o próprio antígeno Austrália (PRINCE, 1969). Além disso, Okochi e Murakami, no Japão, também fizeram a mesma correlação (OKOCHI; MURAKAMI, 1968). Em 1970, os estudos do australiano Dane demonstraram a natureza completa do vírus, com todos os componentes do pacote viral, sendo, então, denominado de partícula de Dane (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970). No ano subsequente, Almeida e colaboradores caracterizaram a partícula, na qual se constituía de um invólucro externo e um núcleo, sendo que esse revestimento externo correspondia ao antígeno Austrália, que passou a designar-se por antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (ALMEIDA; RUBENSTEIN; STOTT, 1971). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1973, propôs que as antigas denominações pelos termos de hepatite por soro homólogo, sérica, pós-transfusional, MS-2, com incubação prolongada ou decorrente do antígeno Austrália, tivessem os nomes substituídos para hepatite B (FOCACCIA, 2013).

Após a confirmação dos achados de Blumberg, o próximo empenho e desafio da comunidade científica foi desenvolver uma vacina capaz de prevenir a enfermidade. Somente em 1981 foi registrada a vacina isolada das partículas virais presentes plasma de portadores crônicos que demonstrava boa tolerabilidade e eficácia, conferindo a imunoproteção contra o vírus em 95% dos casos (BLUMBERG, 2006). Desde 1986, a preparação derivada de plasma foi gradualmente

substituída por outra mais segura e imunogênica, graças a uma novidade biotecnológica. E, assim, a primeira vacina recombinante para a hepatite B foi produzida pela ferramenta da engenharia genética, utilizando a tecnologia do DNA recombinante pela expressão heteróloga de proteínas (VALENZUELA et al., 1982). Até hoje, o HBsAg recombinante produzido por leveduras é a base da vacina contra o VHB (TOITA et al., 2015). No Brasil, em outubro de 1989, iniciou-se um programa de vacinação em populações de áreas endêmicas na região amazônica (FONSECA, 2007). Entre 1990 e 1992, a vacina foi integrada no Programa Nacional de Imunização pelo Ministério da Saúde, sendo o segundo país do mundo, daquele instante, a promover a vacinação em massa (FONSECA, 2010).

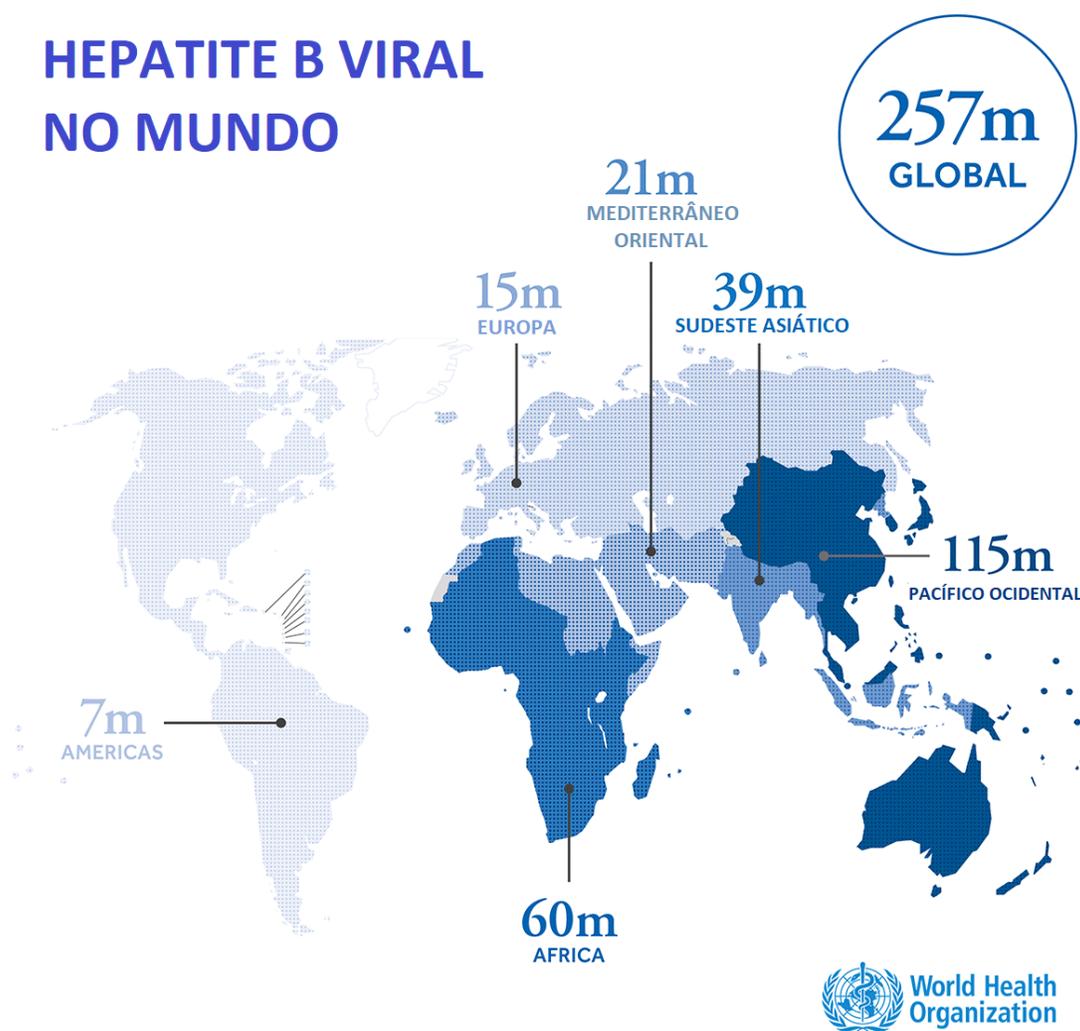
Por fim, em 2012 houve um achado arqueológico importante. BAR-GAL e colaboradores reportaram a descoberta do vírus da hepatite B extraído do fígado de uma múmia coreana do século 16, sendo este, o genoma viral completo mais antigo encontrado. Baseado no cálculo de ancestralidade comum, os autores sugeriram que a origem da sequência genética remonta pelo menos a 3.000 anos atrás.

2.1.2 Epidemiologia

Levando em consideração os esforços para a erradicação do VHB em políticas de saúde através de programas de orientação, triagem e imunização, a epidemiologia universal da infecção tem passado por mudanças nos últimos anos (LOCARNINI et al., 2015; NELSON; EASTERBROOK; MCMAHON, 2016). A dispersão da hepatite B tem regredido, apresentando uma distribuição bem variada, com prevalência local, vias de transmissão e genótipo diferindo amplamente entre as regiões geográficas (MACLACHLAN; COWIE, 2015; OTT et al., 2012). A OMS tem estimado, dados de 2015, que a magnitude de 257 milhões de pessoas do mundo, isto é, 3,5% da população geral, são portadores crônicos (Figura 1), resultando em 887 mil óbitos em detrimento das complicações da enfermidade (WHO, 2017b). Os pacientes crônicos têm entre 15-40% de risco de desenvolver cirrose, insuficiência hepática ou carcinoma hepatocelular, e entre 15-25% de risco de morte em consequência dessa patologia (LOK; MCMAHON, 2001); (MARGOLIS et al., 1995).

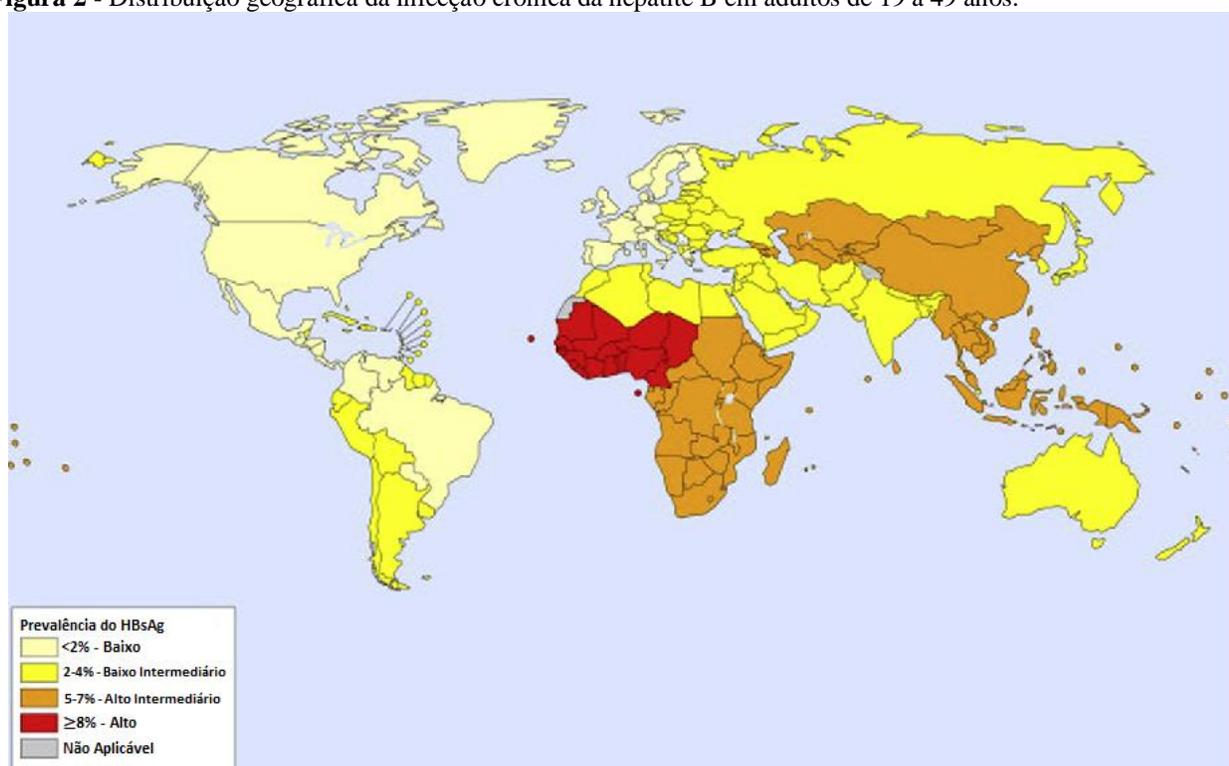
A epidemiologia da hepatite B pode ser descrita em termos da prevalência do antígeno típico da infecção na população (Figura 2). As áreas classificadas de maior prevalência ($\geq 8\%$) são as regiões da África tropical e do Pacífico ocidental, o que representa 45% de todas as pessoas infectadas. As áreas com prevalência intermediária (2-7%) incluem Japão, Índia, partes da Ásia Central, Oriente Médio, leste e sul da Europa, partes da América Latina e representa a proporção global de 40% da população. A prevalência é menor ($< 2\%$) na América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e alguns países da América do Sul. As pessoas que vivem nessas regiões constituem a minoria, 12% da população mundial (MACLACHLAN; COWIE, 2015; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). Os fluxos migratórios de áreas de alta prevalência para áreas de baixa prevalência também tem exercido impacto significativo sobre a epidemiologia da doença (MITCHELL et al., 2011; COWIE; CARVILLE; MACLACHLAN, 2013).

Figura 1 - Prevalência global da infecção crônica da hepatite B no ano de 2015.



Fonte: OMS (2017).

Figura 2 - Distribuição geográfica da infecção crônica da hepatite B em adultos de 19 a 49 anos.

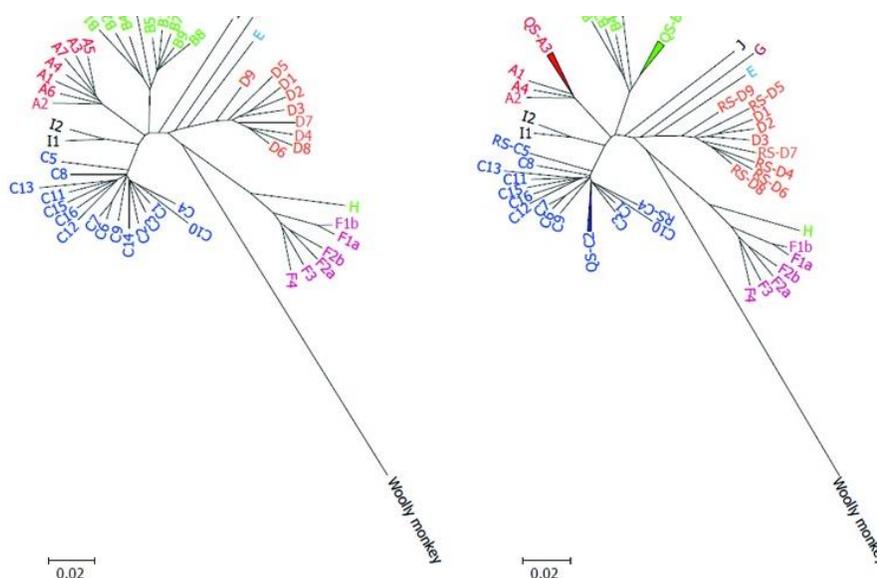


Fonte: Adaptado de Ott (2012).

Um genótipo é uma variante viral que difere suficientemente de outros tipos variantes do mesmo vírus, constituindo um grupo filogeneticamente distinto (FOCACCIA, 2013). O VHB atualmente apresenta 10 genótipos designados, em ordem alfabética, da letra A a J distribuído geograficamente em distintas regiões do mundo. Com base na análise evolutiva, 8 genótipos estão confirmados (A a H) e 2 são prováveis candidatos (I e J), além de ter diversificado quase 40 subgenótipos. Pelo sequenciamento genômico, os genótipos isolados estão definidos em grupos que apresentam divergência maior que 7,5% na sequência completa; e ao menos, 4% de diferença na sequência de nucleotídeos para identificar intergrupos. Tais subgenótipos são descritos pela nomenclatura de números (Figura 3) (POURKARIM et al., 2014).

O genótipo A é altamente predominante na África subsariana (subtipo A1), no norte da Europa (subtipo A2) e na África Ocidental (subtipo A3). Os genótipos B e C são mais prevalentes do sudeste Asiático (KAO, 2011). O genótipo D é remanescente da Europa central e mediterrânea, norte da África, Oriente Médio e Índia. Genótipos menos difusos como o genótipo E é proveniente do sul da África. O genótipo F é considerado autóctone da América do Sul e Central, e provavelmente é originário de populações ameríndias. O genótipo H é procedente da América Central e do centro da América do Norte (CAMPOS; MBAYED; PINEIRO Y LEONE, 2005), enquanto o genótipo G foi detectado na França, Alemanha e nos Estados Unidos (PAPASTERGIOU et al., 2015). Também, há pouco tempo atrás, o genótipo I foi isolado no Vietnã e Laos (THUY et al., 2010); e finalmente, o genótipo J foi identificado no Japão em um combatente da Segunda Guerra Mundial (TATEMATSU et al., 2009). No Brasil, devido à miscigenação, a distribuição dos genótipos é diversificada, com circulação majoritária dos genótipos A, D e F (PEREIRA et al., 2009; MELLO et al., 2007; ARAUJO et al., 2004).

Figura 3 – Dendogramas pelo método de *neighbour-joining* representando os genótipos e subtipos do VHB. Em A, encontra-se a reconstrução da história filogenética anterior e em B, a proposta de reclassificação.



Fonte: Pourkarim (2014).

O Ministério da Saúde (MS) em convênio com a Universidade de Pernambuco (UPE) e a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) realizou recentemente a maior pesquisa sobre hepatites

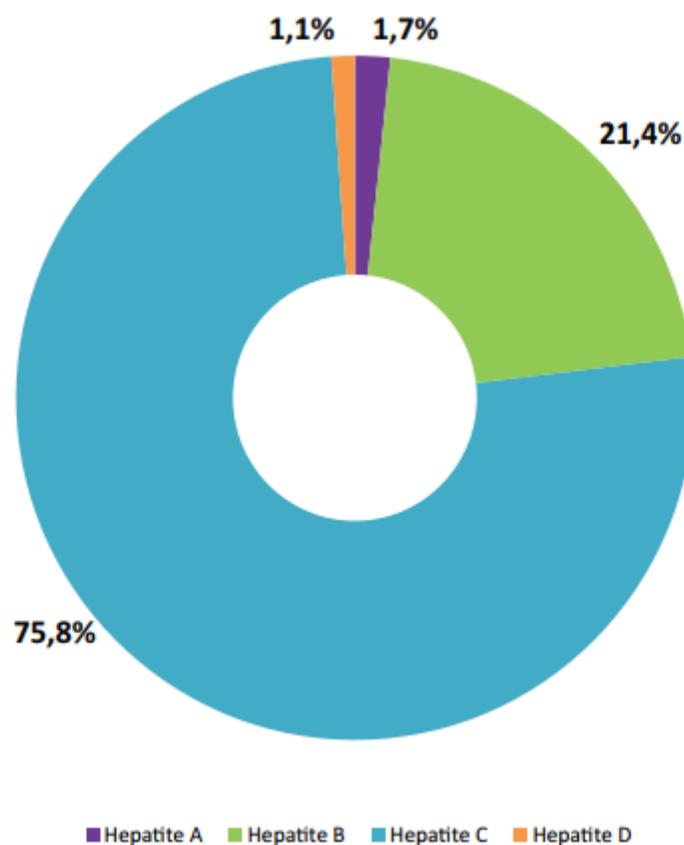
virais já desenvolvida na América Latina. No mais amplo levantamento feito em nosso país, quase mil pesquisadores entrevistaram e coletaram amostras de sangue de 26.102 participantes em todas as capitais brasileiras e no Distrito Federal. Em 19.634 indivíduos entre 19 e 69 anos de idade foi analisado a presença de proteínas indicadoras de infecção pelo VHB. O inquérito nacional cujo título é “Estudo de Prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil”, revelou um quadro melhor que o reportado anteriormente pela OMS, pois a agência internacional classificava a Região Norte como de alta endemicidade, e as demais regiões, como de baixa endemicidade (ZORZETTO, 2011).

Todavia, os índices sugeriram que o Brasil se enquadra numa faixa de baixa endemicidade (< 1%) (BRASIL, 2008). Com base nos resultados, verificou-se que 7,4% tinham evidência sorológica de infecção passada pelo vírus B, embora 0,37% apresentasse hepatite durante o momento da pesquisa. A população residente no conjunto das capitais representa 23,8% (45 milhões de habitantes) da população total. Caso o padrão amostral observado for extrapolado para todo o restante do país, a estimativa de prevalência para a população brasileira geral é de 800 mil pessoas que já tiveram contato com o vírus em algum momento de sua vida (XIMENES et al., 2010; UPE, 2010). Assim, considerando o retrato desse perfil soropidemiológico, os números encontrados são reflexos claros do impacto da vacinação no decurso dos anos (BRASIL, 2016).

Ainda de acordo com dados atualizados do MS, conforme as tendências de distribuição de incidência e prevalência preconizadas pelo boletim epidemiológico das hepatites virais, no período de 1999 a 2017, foram notificados 218.257 casos confirmados de hepatite B no Brasil; desses, a maioria está concentrada na região Sudeste (35,2%), seguida das regiões Sul (31,6%), Norte (14,3%), Nordeste (9,7%) e Centro-Oeste (9,2%). Constatou-se que a hepatite B é a segunda maior causa de óbitos entre as hepatites virais (Figura 4). De 2000 a 2016, foram identificados 14.172 óbitos relacionados ao agravo; desses, 55,2% como causa básica, sendo a maior parte na região Sudeste (41,7%). No entanto, a região Norte foi a que apresentou o maior coeficiente de mortalidade (BRASIL, 2018).

O Estado de Pernambuco é uma Unidade Federativa localizada na Região Nordeste que conta com o diagnóstico descentralizado em 12 Gerências Regionais de Saúde (PERNAMBUCO, 2016). No período de 1999 a 2017 foram registrados 2.858 casos e contabilizados 435 óbitos para o período de 2000 e 2016 (BRASIL, 2018). Em julho de 2013, em virtude de uma medida nacional do MS, Pernambuco ampliou a faixa etária de cobertura vacinal. Além dos recém-nascidos, população pôde ter direito gratuitamente à imunoprevenção em todos os postos de saúde. Com isso, desde 2014, vem apresentando tendência de queda no cenário epidemiológico (PERNAMBUCO, 2016).

Figura 4 - Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico no Brasil de 2000 a 2016.



Fonte: BRASIL (2018).

2.1.3 Transmissão

O VHB está presente no sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais, sangue menstrual, e, em menor grau, no suor, leite materno, lágrimas e urina (SHEPARD et al., 2006). Por exemplo, os vírions completos foram encontrados em demasia no soro de pessoas cronicamente infectadas, numa concentração aproximada de 10^9 por mL (MURRAY; PURCELL; WIELAND, 2006), e já houve registro de 10^{12} equívantes de genoma do VHB por mL, ou seja, uma carga viral de dez bilhões de cópias no referido espécime biológico (THIMME et al., 2003).

O agente etiológico é resistente à aridez e ao calor. É tolerante aos raios ultravioleta e suporta os desinfetantes químicos comuns em concentração moderada. Permanece estável a uma temperatura de -20°C por 20 anos (LU; ZHOU, 2016). A infectividade é perdida após tratamento térmico por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos ou por esterilização através de calor seco a 160°C durante 1 hora (BENNETT et al., 2014). Pode manter-se viável sobre superfícies por 7 dias em ambiente externo e circunstâncias normais, por isso, é facilmente transmitido pelo contato com os fluidos corporais (LAVANCHY, 2004). É um vírus de tamanho grande para atravessar a placenta, portanto, não pode infectar o feto a menos que haja alguma ruptura da barreira materno-fetal (MAHONEY; KANE, 1999).

Embora outros primatas tenham sido infectados em condições laboratoriais, a infecção por VHB afeta apenas humanos. Não se tem notícia de outro hospedeiro animal ou de algum inseto vetor (CDC, 2015). Por ter diferentes fontes de infecção, o microrganismo tem a propriedade de ser ubíquo, exibindo vários caminhos para se alastrar através da população. As vias de transmissão que merecem

ser destacadas são: 1) perinatal; 2) parenteral; 3) sexual; 4) horizontal.

A transmissão perinatal ou vertical é um fator importante na manutenção do reservatório da infecção. O risco de passagem materno-infantil está relacionado com a taxa de replicação na mãe, onde parece existir uma correlação direta entre a carga viral materna e a probabilidade de transmissão (ZHANG et al., 2012). A hepatite B aguda, no terceiro trimestre de gravidez, sem profilaxia, está associada ao aumento do risco de transmissão, mas a maioria das infecções verticais ocorre em crianças nascidas de mães com hepatite crônica por VHB (SHEPARD et al., 2005). A taxa de cronicidade em neonatos oriundos de gestantes com evidências de replicação viral é de cerca de 70% a 90%, e entre 10% a 40% nos casos sem evidências de replicação virológica (PAN et al., 2016). Os infantes são menos capazes de interromper o curso clínico da doença devido à imaturidade do sistema imune. Logo, ressalta-se a importância da aplicação da vacinação neonatal e da administração da imunoglobulina humana anti-hepatite tipo B após o parto (LEE et al., 2006; BRASIL, 2008).

A transmissão parenteral ocorre por meio de compartilhamento de agulhas e seringas no uso de drogas injetáveis (cocaína, anabolizantes e complexos vitamínicos), instrumentos não esterilizados para colocação de piercings, tatuagens, acupuntura, acidente com exposição a material biológico e procedimentos odontológicos, cirúrgicos e de hemodiálise em que não se seguem as normas de biossegurança. A disseminação via transfusão de sangue e hemoderivados tem se tornado rara, em virtude da triagem obrigatória nos hemocentros, o que ocorre no Brasil desde 1978 (BRASIL, 2009). A inoculação percutânea parece ser um modo eficaz de transmissão do VHB, com risco estimado de até 30% em indivíduos sem profilaxia pós-exposição ou vacinação adequada (DEISENHAMMER et al., 2006).

A transmissão sexual é outra importante via uma vez que a hepatite B é considerada uma doença sexualmente transmissível. O contágio ocorre em grande parte pelo contato promíscuo entre homens ou mulheres heterossexuais. Já a incidência entre homens que fazem sexo com homens está em declínio como resultado de modificações de comportamento em resposta à epidemia de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Aquirida, do inglês, "*Acquired Immunodeficiency Syndrome*"). As medidas profiláticas nestas situações são a vacinação dos grupos de risco e práticas sexuais seguras (LOK; MCMAHON, 2001). A transmissão horizontal inclui a propagação domiciliar entre membros da família de um indivíduo cronicamente infectado por meio da descontinuidade da pele e mucosas, especialmente entre crianças. Objetos compartilhados de contato interpessoal como lâminas de barbear, lâminas de depilação, escovas de dente e alicates de unha constituem os principais veículos de contágio (MAUSS et al., 2017; BRASIL, 2009).

Vale ressaltar que existe uma variação considerável na predominância das rotas de transmissão em diferentes áreas geográficas. Desse modo, em áreas de baixa prevalência, como a Europa Ocidental, as vias são, principalmente, as relações sexuais desprotegidas e o uso de drogas intravenosas. Em áreas de alta prevalência, como a África subsariana, a rota perinatal é o modo mais comum de transmissão. A transmissão horizontal, particularmente na primeira infância, é considerada a principal via de transmissão nas áreas de prevalência intermediária (MAUSS et al., 2017).

2.1.4 Classificação Taxonômica

O VHB é o representante modelo da família *Hepadnaviridae*, que engloba os menores vírus envelopados e de capsídeo com arquitetura poliédrica que infectam diferentes animais, contendo um genoma constituído de uma molécula de DNA parcialmente dupla fita (LEE, 1997). A família *Hepadnaviridae* forma seu próprio grupo taxonômico, pois suas características biológicas compartilhadas não são observadas em nenhuma outra família viral. Com base no hospedeiro e nas diferenças filogenéticas, tal agrupamento compreende dois gêneros: os *ortohepadnavírus* que infectam os mamíferos e os *avihepadnavírus*, infectando os pássaros (MAUSS et al., 2017).

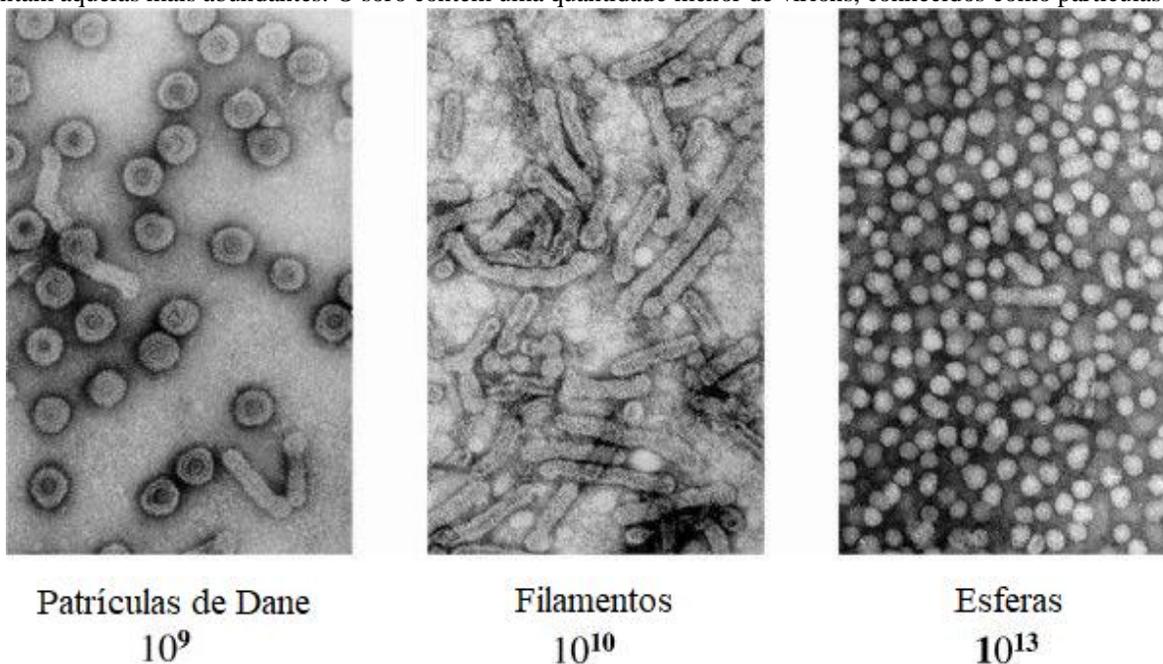
A designação para dois gêneros é baseada nas fortes semelhanças nas seqüência de DNA entre todos os ortohepadnavírus e todos os avihepadnavírus, porém com uma falta quase completa de homologia entre os dois grupos. Uma divergência máxima nas seqüências de cerca de 40% é encontrada entre os ortohepadnavírus, em comparação com cerca de 20% entre os avihepadnavírus (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). No gênero *ortohepadnavírus* estão classificados aqueles vírus que infectam o homem e ocasionalmente primatas superiores como chimpanzés, gorilas, orangotangos e gibões. Até o momento, foram encontrados em humanos (VHB), marmota (WHV) (Korba, 1989), esquilo terrestre (GSHV), esquilo do ártico (ASHV) e macaco do Novo Mundo (WMHBV) (LANFORD et al., 1998). No gênero *avihepadnavírus* estão incluídos os vírus de hepatite de pato selvagem (DHBV) (KORBA et al., 1989), os que infectam garça (HHBV) (SPRENGEL; KALETA; WILL, 1988), ganso de Ross, ganso da neve (SGHBV), cegonha (STHBV) (PULT et al., 2001) e grou (CHBV) (SCHAEFER, 2007).

O VHB possui uma organização genômica singular com arranjos diferenciados nas fases de leitura aberta (ORF) e mecanismo único de replicação assimétrica (NASSAL, 2015). Porquanto, todos os hepadnavírus usam uma transcriptase reversa para replicar seu genoma, eles podem ser considerados membros distantemente relacionados aos retrovírus no cenário evolucionário (ROBINSON; MILLER; MARION, 1987).

2.1.5 Estrutura Viral

Apresenta um mecanismo único entre os demais vírus produzindo e liberando algumas partículas adicionais com morfologias heterogêneas. No soro de um indivíduo infectado pode ser visualizados três formas básicas por microscopia eletrônica: partículas subvirais e vírions infecciosos (Figura 5). Uma peculiaridade é a presença de tipos de partículas esféricas e filamentosas, que são exclusivamente compostas por proteínas do envelope viral e lipídios derivados das células hospedeiras. As ultraestruturas esféricas medem cerca de 22 nm de diâmetro, enquanto as tubulares são de largura similar, mas de comprimento variável. Uma vez que elas são desprovidas do ácido nucléico viral, estas partículas não são infecciosas, embora sejam antigênicas (GLEBE; URBAN, 2007).

Figura 5 - Imagens de microscopia eletrônica por coloração negativa e números respectivos de partículas do VHB em 1 mL de soro de um de portador crônico em período de viremia. As partículas subvirais esféricas podem atingir títulos tão altos que representam aquelas mais abundantes. O soro contém uma quantidade menor de vírions, conhecidos como partículas de Dane



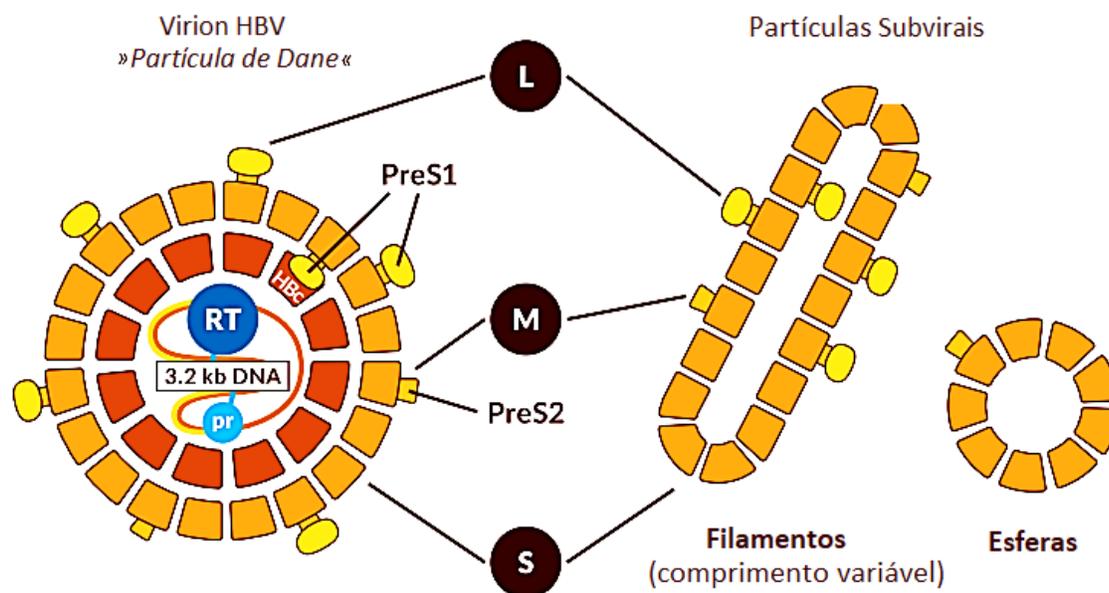
Fonte: Adaptado de Gerlich (2013).

As partículas completas apresentam um diâmetro de aproximadamente 42 nm, contendo um envelope externo membranoso, no qual se situam as proteínas do HBsAg, glicoproteínas e lipídios celulares (Figura 6). Tais elementos estão envolvidos na capacidade de reconhecer a célula hospedeira, garantindo a espécie-especificidade (GLEBE; URBAN, 2007). Alberga em seu interior um nucleocapsídeo (core) central, uniforme, geométrico constituído pelo material genético e por várias unidades monoméricas do capsômero, um polipeptídeo de 183 resíduos de aminoácidos de comprimento (HBcAg – antígeno do core do vírus da Hepatite B). A auto-associação espontânea de 120 dímeros dessa proteína cria um arranjo no core com simetria icosaédrica, em torno de 34 nm (NASSAL, 2015). O HBcAg contém um domínio de montagem e outro domínio de ligação ao ácido nucléico, porção carboxi-terminal rico em arginina, que desempenham um papel ativo na embalagem do RNA pré-genômico junto com a polimerase viral (SELZER; ZLOTNICK, 2015).

Por sua vez, o HBsAg é sintetizado de maneira excedente podendo estar presente em altos níveis, entre 30.000 e 200.000 ng/mL no soro (GERLICH, 2013). Observa-se a existência de três polipeptídeos com ou sem glicosilação:

- Pequeno (*small* - S) – com 226 aminoácidos e massas moleculares de 27 kDa (gp27 - glicosilado) e 24 kDa (p24 – não glicosilado), codificado pelo gene pré-S;
- Intermediário (*medium* - M) – com 281 aminoácidos, 36 kDa (gp36 - diglicosilado) e 33 kDa (gp33 - glicosilado), codificado pelo genes pré-S e Pré-S2;
- Grande (*large* - L) – composto de aproximadamente 400 aminoácidos, 42 KDa (gp42 - glicosilado) e 39 KDa (p39 - não glicosilado), codificado pelo genes pré-S, Pré-S2 e Pré-S1 (FOCACCIA, 2013).

Figura 6 - Modelo do vírus da hepatite B, originalmente denominado de partícula de Dane, e as partículas filamentosas ou esféricas.

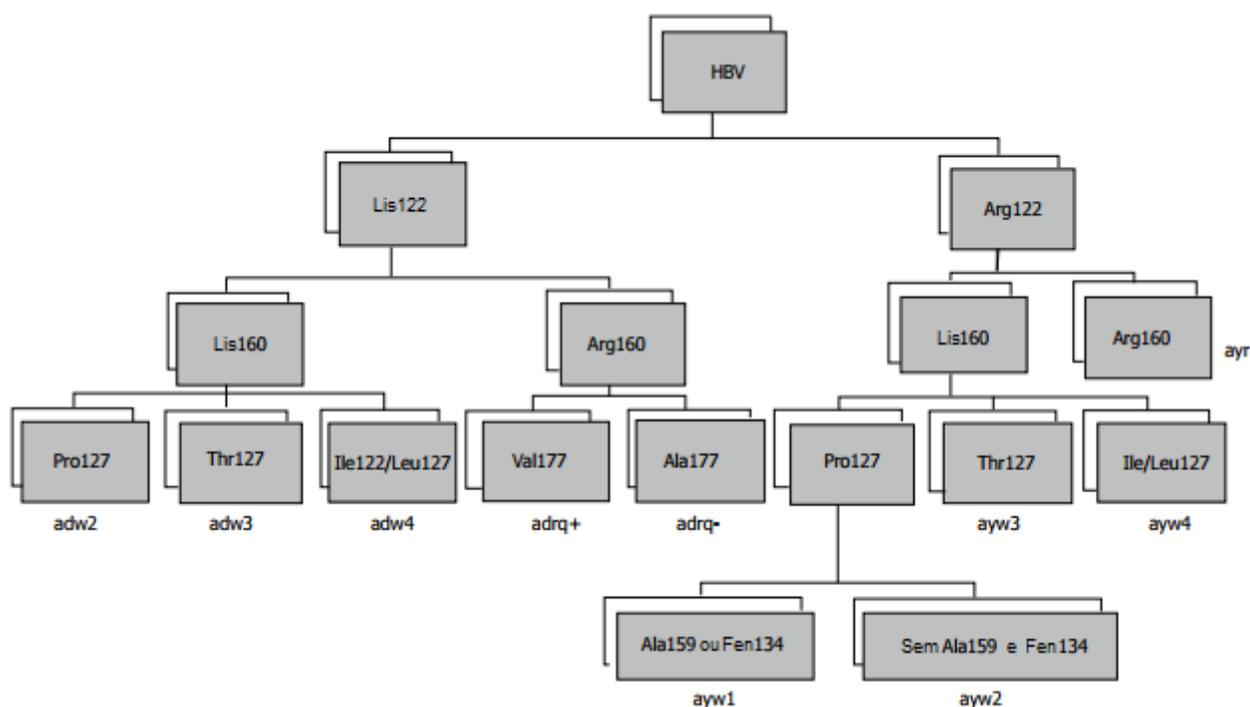


Fonte: Adaptado de Glebe e Urban (2007).

A função biológica do excesso de partículas inertes nos pacientes não é clara. Porém, sugeriu-se que elas possam servir como uma estratégia de evasão virológica contra o sistema imune ao bloquear os anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro e, portanto, aumentar a disponibilidade dos vírions em atingir as células susceptíveis (DANDRI; LOCARNINI, 2012). Sendo assim, com relação à imunogenicidade do HBsAg “small - S”, por ser antigenicamente heterogêneo, diversas especificidades foram registradas:

- Determinante grupo específico – propriedade de um epítipo altamente conservado, denominado pela letra *a*, estando presente em todas as partículas e conferindo imunidade duradoura contra qualquer subtipo viral.
- Dois pares de subdeterminantes - compreendem a dois grupos mutuamente exclusivos: *d* e *y*, *w* e *r*, dando origem a quatro sorotipos principais (notação feita por acrósticos: *ayw*, *adw*, *adr*, *e*, raramente, *ayr*) e a dez subtipos sorológicos: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adw2*, *adw3*, *adw4*, *adrq-*, *adrq+*, *ayr* (Figura 7) (YANO; AZUMA; HAYASHI, 2015).

Figura 7 - Heterogeneidade antigênica do HBsAg. Algoritmo para determinar os subtipos do VHB a partir da variabilidade residente na estrutura primária da proteína do gene S



Fonte: Adaptado de Yano, Azuma e Hayashi (2015).

2.1.6 Organização Genômica

O genoma do VHB consiste de um DNA circular parcialmente dupla fita de aproximadamente 3200 nucleotídeos de comprimento (3,2 Kpb) (Figura 8), variando ligeiramente de genótipo para genótipo (NASSAL, 2015). A fita de polaridade negativa (antissenso) está presente em comprimento total, comportando a informação genética completa (SUMMERS, 1988; LUTWICK; ROBINSON, 1977). Nessa mesma cadeia também contém uma pequena redundância de 8-9 nucleótidos de comprimento, repetição tanto na extremidade 5' quanto na extremidade 3', denominada DR (do inglês, “*direct repeat*”). Essas estruturas redundantes são essenciais para a replicação viral na formação do DNA circular relaxado (SEEGER; GANEM; VARMUS, 1986; NASSAL, 2015). Em contraste, a fita de sentido positivo (senso) abrange apenas 2/3 do comprimento do genoma, enquanto a sua extremidade 3' é de tamanho variável (SUMMERS, 1988; LUTWICK; ROBINSON, 1977). A polimerase viral está covalentemente aderida à fita negativa por uma ligação fosfotirosina.

mesma fase de leitura aberta. A maior proteína do envelope viral (HBsAg “*Large*” - L) é codificada pelas mesmas regiões supracitadas. A proteína de tamanho intermediário de superfície (HBsAg “*Medium*” - M) é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A partir do códon de iniciação situado no início da região S, a menor proteína do envelope (HBsAg “*Small*” - S) é biosintetizada. Todas as proteínas possuem o mesmo códon de terminação, que se localiza no final da região S (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

A região pré-C/C possui dois códons de iniciação na referida ORF. O HBeAg é traduzido a partir do único sítio de iniciação na região pré-C. Primeiramente, é produzido um polipeptídeo precursor, composto de 214 resíduos de aminoácidos, no qual, uma sequência inicial hidrofóbica do peptídeo sinal é responsável pela translocação para o retículo endoplasmático, onde o produto é clivado nas duas extremidades, resultando no antígeno de 159 aminoácidos que é secretado na circulação sanguínea (BRUSS; GERLICH, 1988; SCHÖDEL et al., 1993; KENNEY et al., 1995). O HBcAg tem seu códon de iniciação localizado na região C, a 87 nucleotídeos de distância do sítio de iniciação do HBeAg na região pré-C. Embora ambos possuam similaridade devido uma proteína ser truncada em relação a outra, essa mudança é suficiente para alterar as propriedades conformacionais antigênicas exclusivas de cada (FOCACCIA, 2013).

O gene P cobre quase 3/4 do genoma, recobrando todo gene S e parte do gene C. Sua ORF está deslocada a um nucleotídeo em relação à ORF S. Existem quatro domínios na polimerase viral: o domínio N-terminal, que atua como proteína terminal ou primase para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma parte conhecida como região espaçadora, que aparentemente não apresenta nenhum papel em particular; o domínio enzimático de transcriptase reversa; e o domínio C-terminal que age como RNase H (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). A homologia presente entre a polimerase do VHB e as demais transcriptases reversas está no compartilhamento da região conservada YMDD (Tir-Met-Asp-Asp), que desempenha parte central da atividade biológica de transcrição reversa (BARTHOLOMEUSZ; GROENEN; LOCARNINI, 1997). Pacientes submetidos ao uso continuado dos análogos de nucleosídeos, inibidores da replicação intracelular como a lamivudina, adefovir e entecavir, estão sujeitos a mutações pontuais nesse motivo, desencadeando em mecanismo de resistência aos antivirais (ZOULIM; LOCARNINI, 2009).

Devido à falta de atividade revisora dessa polimerase, há frequentemente incorporação errada de nucleotídeos durante a replicação viral, originando substituições, deleções e inserções randômicas (YANO; AZUMA; HAYASHI, 2015; GUIRGIS; ABBAS; AZZAZY, 2010). Essa impotencialidade de reparar incorreções concede uma plasticidade genética que leva o VHB a evoluir em novas direções, emergindo populações virais bastante heterogêneas (LOCARNINI; ZOULIM, 2010). A taxa de mutação dos hepadnavírus é aproximadamente 100 vezes superior aos outros vírus de DNA, no entanto, a proporção é 100 a 1000 vezes menor quando comparada aos vírus de RNA (BUTI et al., 2005). Apesar da compactação genômica, cerca de 12% dos nucleotídeos ainda podem sofrer variabilidade (FOCACCIA, 2013). A taxa de mutação estimada do VHB é de um erro por 10^4 - 10^5 nucleotídeos diariamente (LOCARNINI; MASON, 2006).

Finalmente, o gene X especifica o HBxAg de 154 aminoácidos que mostra ser essencial para estabelecer a infecção viral produtiva (ZOULIM; SEEGER, 1994; LUCIFORA et al., 2011) e é capaz de transativar eficientemente numerosos genes celulares e virais.

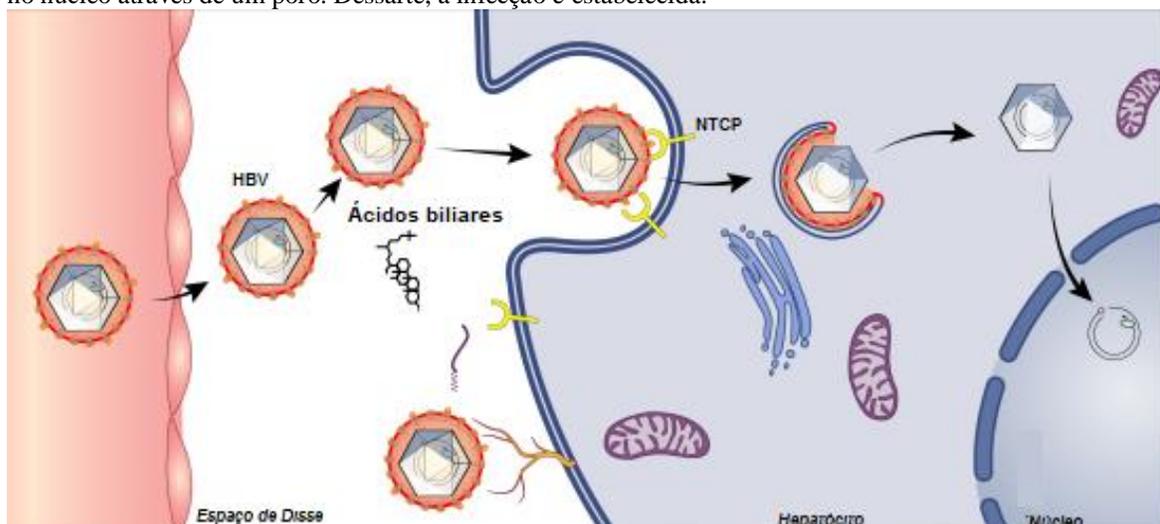
2.1.7 Replicação Viral

Nas últimas décadas, um dos grandes empecilhos para o estudo da biologia molecular do VHB se refere à falta de sistemas eficientes de infecção *in vitro* e de modelos animais experimentais facilmente acessíveis (MAUSS et al., 2017). Essa dificuldade prejudica significativamente a identificação de mecanismos e fatores celulares envolvidos nas várias etapas do seu ciclo replicativo.

Contudo, algumas linhagens celulares de hepatomas apesar de não serem permissivas, suportaram a replicação quando transfectadas com o genoma viral clonado. O desenvolvimento de uma linhagem denominada HepaRG foi capaz de obter suscetibilidade à infecção pelo VHB (GRIPON et al., 2002). Embora o cultivo dessa linhagem celular seja bastante laborioso, a disponibilidade desse sistema revolucionou progressivamente a compreensão do processo de entrada do vírus (SCHULZE et al., 2010). Além do mais, um novo modelo transgênico para a infecção pelo VHB parece ser bastante promissor para estudo dos processos envolvidos na replicação viral (DANIEL; TORBENSON, 2017).

Por se tratar de um parasito celular obrigatório, a primeiro passo do vírus é uma adsorção primária, reversível, de baixa afinidade da proteína grande do envelope (HBsAg “*large L*”) aos proteoglicanos de heparan sulfato expostos na superfície celular (SCHULZE; GRIPON; URBAN, 2007). Subsequentemente, uma ligação irreversível, independente de energia, acontece a um receptor específico do hepatócito (Figura 9) (URBAN et al., 2014).

Figura 9 - Diagrama de entrada do vírus. O HBV percorre a circulação sanguínea, penetra no espaço de Disse e atinge o lado sinusoidal dos hepatócitos. O vírus se fixa à superfície celular por interação com os proteoglicanos de heparan sulfato. O envoltório viral pode sofrer alterações conformacionais após esta ligação. Posteriormente, o domínio pré-S1 da proteína do envelope se liga ao(s) segmento(s) extracelular (es) do NTCP com alta especificidade. A ligação dos vírions ao NTCP pode levar à endocitose do receptor, onde o envelope é perdido, o nucleocapsídeo é desmontado no citoplasma e o genoma é liberado no núcleo através de um poro. Dessarte, a infecção é estabelecida.

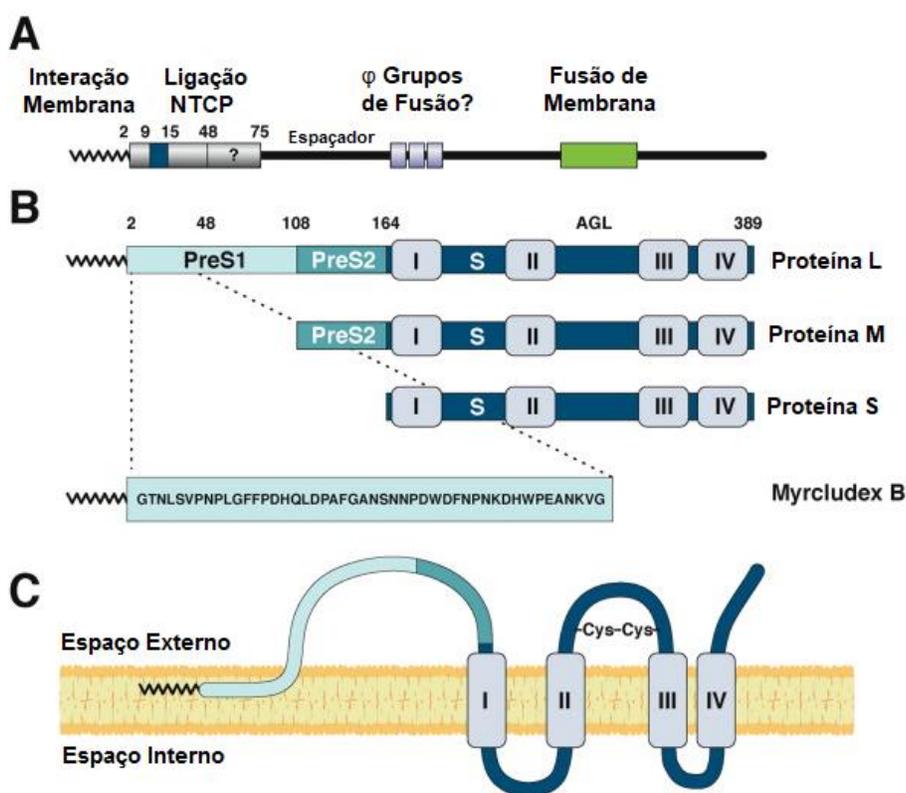


Fonte: Adaptado de Li e Urban (2016).

Lançando mão de análises mutacionais, foram identificados nas proteínas do envelope determinantes (epítomos) essenciais da infectividade. São eles: os 75 resíduos de aminoácidos do

domínio pré-S1 da proteína “*large L*”; a N-miristoilação nesse domínio proteico (modificação pós-traducional que faz o acoplamento do ácido mirístico, um ácido graxo saturado de 14 carbonos); e a região AGL na dobra antigênica da proteína “*small S*” (Figura 10) (GRIPON; CANNIE; URBAN, 2005); (ENGELKE et al., 2006); (MEIER et al., 2013).

Figura 10 - Determinantes de infectividade e estrutura de seus domínios proteicos. (A) Localização dos determinantes de infectividade nas proteínas de superfície do HBV. A miristoilação no N-terminal da proteína “*large L*” é necessária para a adesão na membrana plasmática. A sequência pré-S1 (2-48) interage especificamente com o NTCP. Dentro dessa sequência apresenta um motivo altamente conservado (9-NPLGF(F/L)P-15) que é crucial para a ligação. Além disso, 49 a 75 resíduos de aminoácidos são necessários para a infecção. A funcionalidade precisa desse trecho não é conhecida, mas também é alvo do NTCP. A partir do sítio de ligação do NTCP em direção ao C-terminal da proteína, existe uma região espaçadora que contém a sequência de ligação do nucleocapsídeo para envelopamento viral. No domínio S contém 3 pequenos grupos hidrofóbicos (ϕ) que estão presumivelmente envolvidos na fusão de membrana. Uma complexa conformação com pontes dissulfeto também é requerida na região AGL do domínio S para a infecção. Essa parte provavelmente contribui para a interação com os proteoglicanos de heparan sulfato e para fusão de membrana. (B) As três proteínas do envelope do HBV (HBsAg L, M e S) compartilham da mesma extremidade C-terminal, correspondendo ao domínio S com quatro unidades prováveis (I-IV), mas diferem na extremidade N-terminal pela presença do domínio pré-S2 (uma extensão hidrofílica de 55 resíduos de aminoácidos) na proteína M; e pela presença dos domínios pré-S2 e pré-S1 (107 aminoácidos adicionais, que sofre a miristoilação na glicina 2) na proteína L. O Myrcludex B é um lipopeptídeo sintético derivado dos 47 resíduos de aminoácidos iniciais do domínio pré-S1, que mimetiza o HBsAg “*large L*”. Desse modo, o Myrcludex B é uma droga que inibe a entrada do VHB ao inativar a função receptora do NTCP. (C) Suposta topologia da proteína “*large L*” sobre o vírion com o domínio pré-S voltado para fora. Note que o sítio de ligação dentro do domínio pré-S1 está possivelmente ocultado no envelope lipoproteico viral. Os resíduos de cisteína unidos por pontes dissulfídicas, como parte da região AGL, são requisitos para a infectividade.



Fonte: Adaptado de Urban (2014).

Como a identidade de um receptor permaneceu um mistério por muitos anos, a descoberta recente e bem sucedida do ligante funcional que permite a penetração do VHB em células primárias do fígado humano, foi um achado importante. Uma compreensão detalhada da ligação ao receptor e da captação pela membrana plasmática é de interesse geral para a virologia molecular, como também pode fornecer subsídios para novas estratégias de tratamento que interferem com os primeiros passos da infecção a fim de proporcionar o controle e cura viral (VERRIER; SCHUSTER; BAUMERT, 2017).

Percebeu-se que a sequência pré-S1 da proteína “*large L*” modificada pela miristoilação na

porção aminoterminal interage especificamente com o polipeptídeo co-transportador de Na^+ /taurocolato (NTCP), um transportador transmembranar predominantemente expresso na membrana basolateral em hepatócitos diferenciados (YAN et al., 2012; LI; URBAN, 2016). O NTCP é codificado pelo gene SLC10A1 e é responsável pelo transporte de ácidos biliares conjugados, bem como de alguns medicamentos do sangue portal para o fígado, desempenhando um papel crítico na homeostase e na circulação enterohepática (ANWER; STIEGER, 2014). Outros estudos *in vitro* também mostraram que a penetração do VHB é inibida por ciclosporinas e oxisteróis, que são conhecidos por se ligarem ao NTCP (NKONGOLO et al., 2014); (WATASHI et al., 2014).

Após a ligação à membrana plasmática, admite-se duas possíveis vias de internalização. Evidências experimentais sugerem que o VHB pode estar envolvido num processo de endocitose, seguido do desnudamento de sua capa lipoproteica em vesículas intracelulares; ou o VHB pode entrar nas células hepáticas após a fusão do envelope viral com a membrana plasmática. Assim que os nucleocapsídeos alcançam o citoplasma, o DNA circular relaxado (rcDNA, do inglês, “*relaxed circular DNA*”) ligado à polimerase precisa ser inserido no núcleo da célula para converter o genoma viral em uma forma circular covalentemente fechada (cccDNA, do inglês, “*covalently closed circular DNA*”) (NASSAL, 2015).

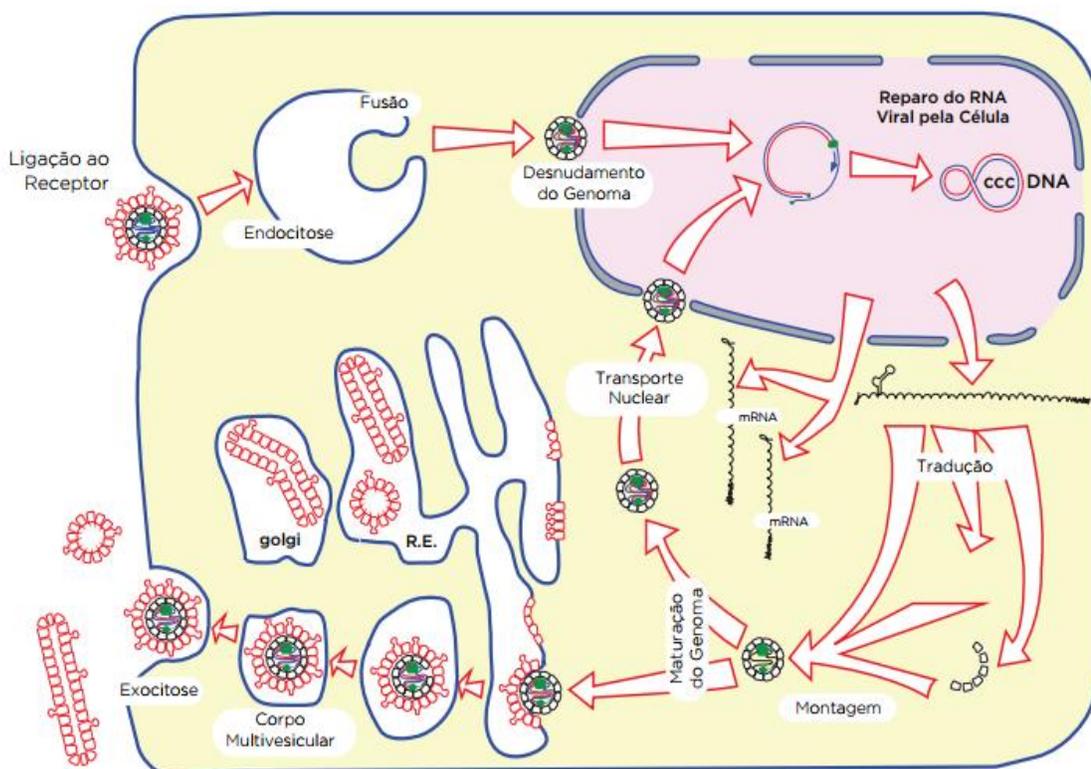
Estudos anteriores mostraram que os capsídeos são transportados através dos microtúbulos para a periferia nuclear (RABE; GLEBE; KANN, 2006). O acúmulo dos capsídeos virais nas proximidades facilitaria a interação com receptores de transporte nuclear e proteínas do complexo de poros nucleares (Figura 11) (KANN et al., 1999). Em seguida, os capsídeos eventualmente se desintegram, o que permite a liberação do rcDNA do VHB e sua difusão para o nucleoplasma (SCHMITZ et al., 2010). O estabelecimento de uma infecção produtiva exige a remoção da polimerase viral e a finalização da cadeia positiva pela maquinaria replicativa da célula para formar a molécula de cccDNA superenrolada, que é então incorporada à cromatina, servindo como molde para transcrição viral (NASSAL, 2015).

A ligação de fosfodiéster da polimerase viral na extremidade 5' da fita negativa se assemelha à ligação fosfotirosina transitória das topoisomerases associadas ao DNA (NASSAL, 2015). As topoisomerases regulam o superenrolamento do DNA celular excisando uma (TOP1) ou ambas as fitas do DNA (TOP2), de modo a aliviar a tensão torcional na dupla hélice durante a replicação ou a transcrição (ASHOUR; ATTEYA; EL-KHAMISY, 2015). Tais adutos proteicos formados por essas endonucleases, são retirados pelo mecanismo de reparo da tirosil-DNA-fosfodiesterase (TDP) 1 ou TDP2 (POMMIER et al., 2014). Devido à similaridade da natureza química nas ligações, estudos recentes apontaram fortes evidências de que o VHB, após a desencapsidação, realmente se utilize da atividade de reparo nucleolítica da enzima TDP2 para clivar a polimerase viral do DNA circular relaxado, e assim, iniciar a formação do cccDNA (KÖNIGER et al., 2014).

O cccDNA pode não estar incorporado ao genoma do hospedeiro porém, a integração pode ocorrer particularmente ao longo do *turnover* no hepatócito e na presença de danos ao DNA. (DANDRI et al., 2002; SUMMERS; MASON, 2004). Contudo, na forma episomal, simulando um

minicromossomo livre e estável com uma estrutura semelhante a um plasmídeo organizado por histonas e proteínas não histônicas (TROPBERGER et al., 2015; BOCK et al., 2001), o cccDNA usa a maquinaria transcricional da célula a fim de gerar RNAs intermediários para síntese proteica e replicação do vírus, a qual ocorre no citoplasma, seguida da transcrição reversa do longo molde de 3,5 Kpb do pgRNA.

Figura 11 - Ciclo de vida do VHB: O reconhecimento dos receptores específicos do fígado (proteoglicanos de heparan sulfato e NTCP) permite a invasão pelo vírus e a liberação no citoplasma de partículas do core. Elas são carregadas em direção ao complexo de poros nucleares onde o genoma do VHB pode ser introduzido no interior do núcleo celular. Uma vez no núcleo, o DNA viral se liga a fatores de reparo e é maturado na forma de DNA circular covalentemente fechado. Essas moléculas se mantêm na forma epissômica as quais são usadas pela RNA polimerase II para transcrever RNAs mensageiros pré-genômicos e subgenômicos, que são transportados ao citoplasma, normalmente sem processamento por *splicing*, para ser traduzidos em proteínas virais. Dois transcritos subgenômicos servem para síntese do HBsAg ao serem traduzidos no retículo endoplasmático rugoso, montando as partículas subvirais que são secretadas através do aparelho de Golgi. Ao passo que o RNA pré-genômico é decodificado no citosol, sendo precursor para a produção de novas partículas virais, ou pode ser encapsulado nas partículas nascentes junto à polimerase viral. Os genomas do HBV amadurecem dentro dos capsídeos via transcrição reversa, onde o RNA pré-genômico é convertido em DNA. As partículas do core maduras podem migrar novamente para o complexo de poro nuclear ou são envolvidas por uma bicamada lipídica e proteínas de superfície (L, M e S) para extrusão no meio extracelular através de corpos multivesiculares.



Fonte: Adaptado de Gerlich (2013).

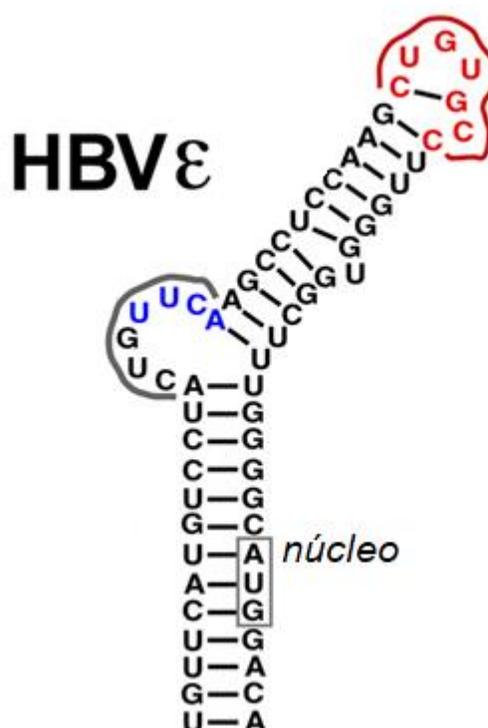
Curiosamente foi relatado um mecanismo de retroalimentação do genoma viral maduro em que as cópias moleculares recém-sintetizadas em vez de serem empacotadas e secretadas no sangue, são conduzidas de volta ao núcleo para garantir a manutenção de um estoque de *pool* genético. Dessa maneira, a biogênese e subsistência indefinida do cccDNA são pontos-chaves para sustentar e reativar a longo prazo os reservatórios de infecção do VHB. A descoberta desse estado de latência viral pode ser alvo de novas abordagens terapêuticas em relação à cura da hepatite B crônica (NASSAL, 2015). Além disso, outros estudos tem apoiado a ideia da perpetuação da infecção pela estabilidade do cccDNA dentro de hepatócitos quiescentes (LUTGEHETMANN et al., 2010); (DANDRI; PETERSEN, 2005).

Vários fatores de transcrição, incluindo coativadores, repressores e enzimas modificadoras de

cromatina regulam a atividade do epissomo (LEVRERO et al., 2009); (TROPBERGER et al., 2015). No entanto, embora se conheça uma série de fatores que modulam a transcrição viral, os mecanismos moleculares exatos envolvidos, no caso do VHB, ainda estão pouco definidos. Tanto o RNA mensageiro quanto os RNAs pré-genômicos são transportados para o citoplasma, onde são traduzidos ou utilizados como modelo para a produção da progênie viral. Assim, a transcrição do pgRNA é um passo crítico para a multiplicação do genoma e determina a taxa de biosíntese do VHB (MAUSS et al., 2017). Este artifício genético de replicação através de distintos intermediários de RNA não ocorre entre os outros vírus que infectam o ser humano (GERLICH, 2013).

O próximo passo decisivo na replicação do VHB é a embalagem específica do pgRNA conjuntamente à transcriptase reversa nos novos capsídeos. O pgRNA possui uma estrutura secundária denominada elemento épsilon (ϵ) que está presente tanto na extremidades 5' quanto 3'. O elemento ϵ é um motivo de 137 nucleotídeos de comprimento que forma uma estrutura de alça em grampo de RNA (*loop*) que é conservada entre todos os hepadnavírus conhecidos (SELZER; ZLOTNICK, 2015) (Figura 12). O *loop* na extremidade 5' é reconhecida pela polimerase viral e atua como o sinal de encapsidação (BARTENSCHLAGER; SCHALLER, 1992). A ligação coordenada da polimerase à estrutura do *stem-loop* do RNA inicia o empacotamento de uma molécula de pgRNA. O primeiro produto é um DNA de fita simples de polaridade negativa. Devido ao seu mecanismo exclusivo de iniciação, sua extremidade 5' permanece covalentemente ligada à polimerase. O pgRNA é degradado pelo domínio da ribonuclease H à medida que é retrotranscrito, exceto, a extremidade 5', onde aproximadamente 15 a 18 nucleotídeos são preservados e servem como iniciador para síntese da fita positiva de DNA, resultando no rcDNA (NASSAL, 2015; SELZER; ZLOTNICK, 2015).

Figura 12 - Subelementos funcionais da estrutura ϵ . A saliência central e a alça apical são determinantes estabelecidos para sua funcionalidade. As sequência apical em vermelho indica um hexaloop clássico do VHB.



Fonte: Adaptado de Gajer (2017).

No passo final da replicação, a montagem e exocitose das partículas virais também não estão totalmente compreendidos. O envelopamento do nucleocapsídeo requer uma coexpressão balanceada das proteínas de superfície (HBsAg L e S) a fim de os recrutar para o sítio de brotamento. Além do mais, a liberação das partículas virais infecciosas sucede através de exossomos em corpos multivesiculares, enquanto que a liberação de partículas subvirais prossegue pela via secretória (HOFFMANN et al., 2013). Embora o papel das proteínas do envelope na regulação da amplificação do cccDNA não esteja bem caracterizado, estudos recentes indicam que a falta de expressão de proteínas do envelope aumenta os níveis do cccDNA, enquanto a coexpressão das proteínas do envelope tanto favorece a secreção do vírus como restringe a terminação da fita positiva (LENTZ; LOEB, 2011).

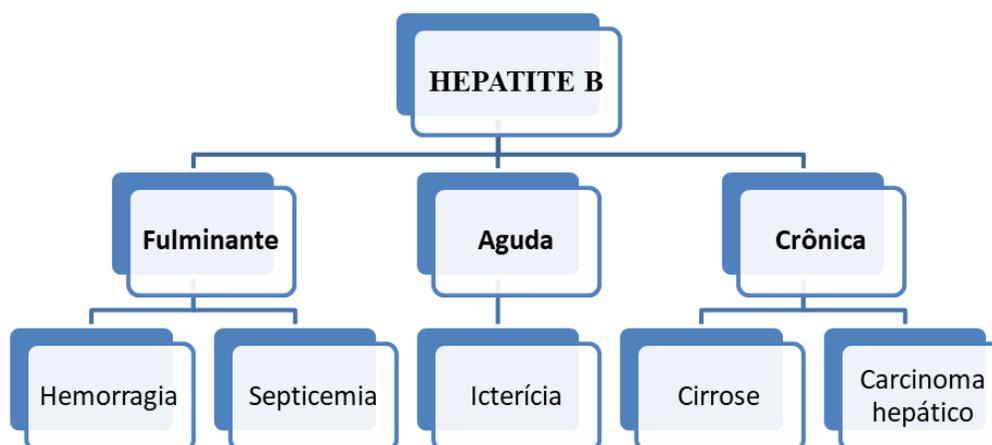
2.1.8 História Natural e Manifestações Clínicas

A hepatite por vírus B pode se apresentar sob diferentes formas clinicopatológicas evolutivas. O conhecimento acumulado da história natural ao longo das últimas décadas tornou-se fundamental para a gestão clínica da enfermidade. O curso natural da infecção é uma interação bem sucedida e complexa de fatores virológicos, ambientais e do hospedeiro. Tendo em vista que o VHB possui hepatotropismo, o vírus não causa efeito citopático (FELD, 2017) e apresenta um ciclo lisogênico (WEEKS; ALCAMO, 2008). A história natural da patogênese é determinada principalmente pela relação dinâmica entre a replicação viral, e a imunidade adaptativa celular e humoral do hospedeiro (CROAGH; LUBEL, 2014). Mas, outros fatores que podem desempenhar um papel importante na progressão da doença hepática relacionada ao VHB, incluem gênero, consumo de álcool e infecção concomitante com outros vírus de hepatite (MAUSS et al., 2017). O VHB pode ficar incubado no organismo por 30 a 180 dias e o sujeito pode progredir para três desfechos (Quadro 1):

Hepatite aguda benigna – forma clínica de curso autolimitado, às vezes, com manifestações clínicas extra-hepáticas, mas que no geral desaparecem após a cura ou remissão clínica;

Hepatite fulminante – evolução aguda com degeneração e necrose massiva dos hepatócitos, evoluindo subitamente para insuficiência hepática, o que pode determinar em óbito caso um transplante emergencial não seja efetuado;

Hepatite crônica – forma clínica de manutenção da replicação viral onde os danos ao parênquima hepático e reparo tecidual podem ocorrer em tempo e grau variáveis (FOCACCIA, 2013).

Quadro 1 - Esquema resumido das possíveis evoluções clínicas da Hepatite B.

Fonte: Elaborado pelo autor.

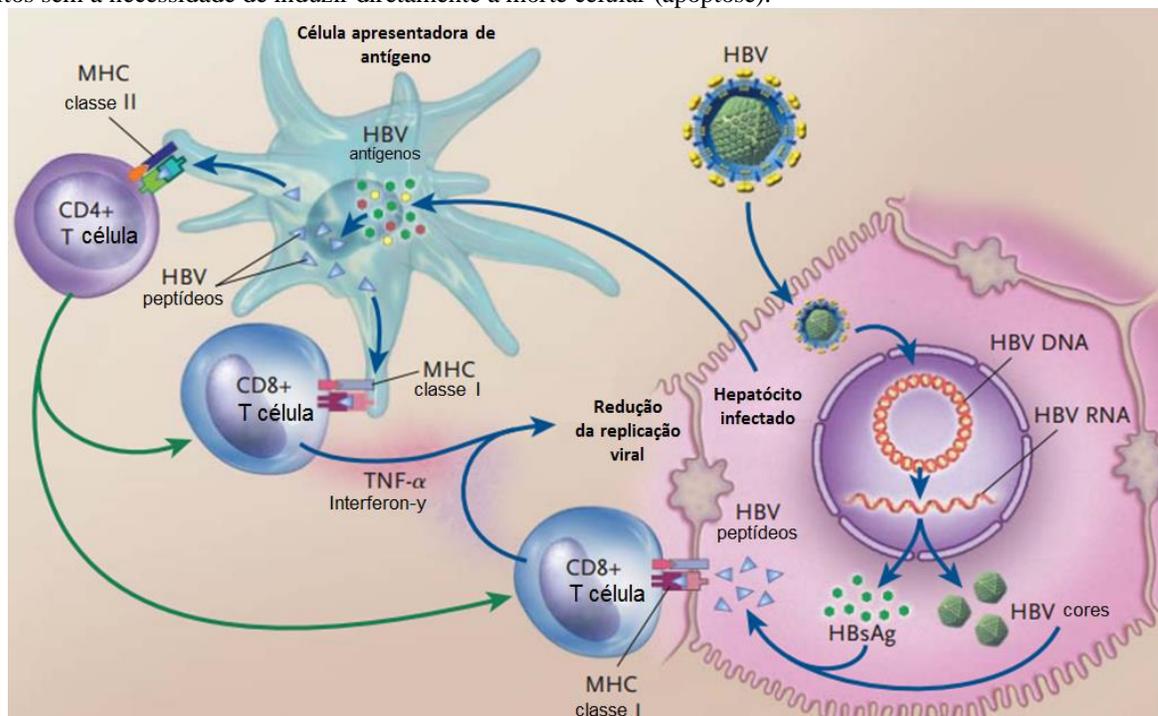
2.1.8.1 Hepatite Aguda

Dentre as hepatites virais, a hepatite B é a que mais se exterioriza clinicamente. O quadro agudo tem seus aspectos clínicos virológicos limitados aos primeiros 6 meses. Após o período de incubação do VHB, os sintomas quando presentes, previamente se expressam com pródromos de duração variável e sinais inespecíficos, os quais incluem estado adinâmico, fadiga extrema, náuseas, vômitos, febre, hepatomegalia, esplenomegalia, dor abdominal e epigástrica, anorexia, e é muito comum a intolerância a alimentos gordurosos e ao tabagismo (FOCACCIA, 2013).

Além disso, pode apresentar manifestações afetando outros órgãos pela formação e deposição de imunocomplexos, como a síndrome da doença do soro (febre, exantemas cutâneos, artralgias). Em seguida, a sintomatologia prodrômica tende a desaparecer ou a reduzir acentuadamente, restaurando a disposição física, mental e o bem-estar. Geralmente, é nesse momento que há o aparecimento da icterícia, hiperbilirrubinemia intensa, colúria e hipocolia fecal. Ao menos, 70% dos pacientes irão desenvolver formas subclínicas ou anictéricas, enquanto que menos de 30% dos indivíduos demonstrarão a fase ictérica, que é patognomônica e reconhecida clinicamente (MAUSS et al., 2017).

Entretanto, a maioria deles irão evoluir para a remissão clínica da doença. Após um período de 24 semanas, as hepatites agudas benignas progridem para a cura completa gerando imunidade específica. A recuperação é dependente dos linfócitos B que produzem anticorpos contra os antígenos das regiões pré-S e S, bem como pela resposta dos linfócitos T. Assim, aqueles com infecção aguda benigna exibem uma potente resposta policlonal MHC de classe I restrita dos linfócitos T citolíticos (CD8+) contra múltiplos epítomos do envelope viral, do nucleocapsídeo vírico e da polimerase endógena do VHB. Quando a resposta dos linfócitos T citolíticos e dos linfócitos T auxiliaries (CD4+) é fraca e limitada a poucos determinantes antigênicos, a infecção pode se tornar crônica (Figura 13) (LOK, 2000).

Figura 13 - Resposta imune celular contra o VHB. O vírus se replica dentro das células hepáticas para produzir vírions e partículas subvirais. Ambos podem ser fagocitados pelas células apresentadoras de antígeno que degradam as proteínas virais em peptídeos e os expõe na superfície celular ligada às moléculas MHC classe I ou II. As células apresentadoras de antígeno também podem processar e exibir antígenos virais fagocitados de hepatócitos infectados mortos. Estes antígenos peptídicos podem ser reconhecidos por linfócitos T CD8+ ou CD4+ e assim, tornam-se sensibilizadas. As células T citotóxicas CD8+ ativadas (também com ajuda das células T CD4+, seta verde) poderão reconhecer antígenos virais expressos em cadeias do MHC de classe I na membrana de hepatócitos infectados. Essa reação de reconhecimento pode levar a lise direta do hepatócito infectado, ou pode induzir à liberação de interferon- γ do TNF- α , o que pode inibir a replicação viral no interior dos hepatócitos sem a necessidade de induzir diretamente a morte celular (apoptose).



Fonte: Adaptado de Ganem e Prince (2004).

2.1.8.2 Hepatite Fulminante

Raramente as hepatites agudas benignas podem avançar para formas graves que cursam com alta letalidade. Apenas 0,1 a 0,5% dos agudamente enfermos desenvolvem uma síndrome com falência do fígado e insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (MAUSS et al., 2017), atingindo uma taxa de mortalidade em torno de 70% (MINA et al., 2015). A transmissão vertical e parenteral pelo VHB é uma causa comum de insuficiência hepática aguda grave (IHAG) em países ocidentais (BERNAL et al., 2010; CANBAY et al., 2009). As hepatites fulminantes se caracterizam pela evolução rápida para a IHAG devido às lesões hepatocelulares (JAYAKUMAR et al., 2013). Nesta hepatopatia há uma resposta imune vigorosa levando a uma eliminação eficiente do vírus, mas a um elevado custo. A velocidade de instalação da necrose hepática impede uma resposta regenerativa compensadora do organismo (FOCACCIA, 2013).

Em geral, verifica-se aparecimento de coagulopatia, de acordo com o teste convencional (razão normalizada internacional, $INR \geq 1,5$), desenvolvimento de encefalopatia (LARSON, 2010), distúrbios sensoriais e sintomas associados como confusão mental, sonolência, excitabilidade, coma, asterixe, distúrbios hidroeletrólíticos e metabólicos, além do quadro de insuficiência renal e infecções bacterianas do trato respiratório. Neste desfecho, instala-se súbita necrose hepatocelular maciça, acompanhada do clareamento dos antígenos virais do soro (HBsAg, HBcAg), com surgimento precoce dos anticorpos anti-HBs e anti-HBc (FOCACCIA, 2013).

2.1.8.3 Hepatite Crônica

A persistência da infecção após 6 meses caracteriza a cronicidade. A taxa de progressão do VHB agudo para o crônico é determinada principalmente pela idade ao contrair a infecção. Recém-nascidos que se infectaram durante a gestação ou pelo canal do parto ou puerpério imediato cronificam em aproximadamente 90% dos casos. Em crianças de 1 a 5 anos de idade, o risco de cronificação varia entre 20% e 50%. Em adultos hígidos do ponto de vista imunológico, o risco cai para cerca de 5% a 10% (GANEM; PRINCE, 2004). Portanto, as pessoas nesse estágio são capazes de transmitir a doença e tem importância epidemiológica na perpetuação da endemia.

Os sintomas irão depender da gravidade da agressão hepática. Em seu início, a hepatite costuma ser silenciosa e indolente. A maioria dos casos são clinicamente assintomáticos. Na doença avançada, pode haver esplenomegalia, angioma-de-aranha, cabeça-de-medusa, eritema palmar, atrofia testicular, ginecomastia. Em pacientes com cirrose descompensada, icterícia, ascite, edema periférico e encefalopatia podem estar presentes (MAUSS et al., 2017). Sinais histológicos de lesão no fígado são: inflamação com ou sem formação de fibrose (BRASIL, 2009). A fibrose é potencialmente reversível quando a replicação do VHB é controlada (MAUSS et al., 2017). Outras complicações extra-hepáticas são a poliarterite nodosa com vasculite necrotizante e a insuficiência renal por doença glomerular (glomerulonefrite membranosa). Elas ocorrem em até 10% dos pacientes com VHB crônico mediados por complexos imunes circulantes (SHIM; HAN, 2004).

Diferentemente da aquisição na infância ou na idade adulta, a evolução crônica a partir da infecção neonatal possui classicamente três divisões conceitualizadas, em termos do estado de equilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e a patogenia do VHB: a) fase de imunotolerância, b) fase de imunoe eliminação, e c) fase não replicativa tardia. Inicialmente, existe uma fase de imunotolerância, que se caracteriza por altos níveis de replicação viral e com baixas taxas de soroconversão espontânea do HBeAg para o anti-HBe (CHANG, 2008). Nesse momento, o sistema imune é bastante condescendente ao microrganismo, por conseguinte, a resposta imune é mínima ou ausente aos estímulos antigênicos do VHB (DIENSTAG, 2008). O mecanismo de indução da tolerância ainda não está completamente elucidado, mas cogita-se que o HBeAg, ao conseguir transpassar a barreira placentária durante a gravidez, suscite infecção persistente altamente produtiva no feto (TRAN, 2011; MILICH et al., 1990). Como mostrado por David Milich, o HBeAg atua como um modulador imunológico e suprime o reconhecimento de células que expressam o HBcAg ao linfócitos T (MILICH et al., 1998). Essa etapa é curta ou mesmo ausente em pacientes que adquirem o vírus na idade adulta (NEBBIA; PEPPA; MAINI, 2012).

Após a segunda a terceira década, durante o período replicativo, o paciente precocemente com hepatite B entrará na fase de imunoe eliminação onde ocorre gradativo aumento da taxa de depuração do HbeAg. Quando o vírus se torna reconhecido pelo sistema imune como patógeno invasor, verifica-se exacerbações da patologia produzida por intensa e súbita lise de hepatócitos infectados a fim de levar à depuração dos antígenos (ILOEJE et al., 2006; FARRELL, 2000). Depois de uma fase de debelação imune bem sucedida, tem-se a transição para a fase residual não replicativa, por vezes, referida como

estado de portador inativo. Ela é caracterizada pela presença contínua no soro do HBsAg, ausência de HBeAg e presença de anticorpos anti-HBe. Pacientes com tempo prolongado dessa transição acarretam muitos episódios de necroinflamação e regeneração do fígado. Esse processo é responsável pelo desenvolvimento de fibrose do órgão. Por consequência, eles terão maior probabilidade de desenvolver esteatose e cirrose hepática; e provavelmente carcinoma hepatocelular no futuro (CHU, 2000).

Ademais, a influência de fatores virológicos específicos no curso da hepatite B crônica está sendo cada vez mais admitida. Existem evidências de que os genótipos do VHB podem diferir em suas propriedades patogênicas e com isso alterar o curso natural da enfermidade. Alguns estudos destacam a relevância da virulência dessas variantes virais causando diversas manifestações clínicas. Os diferentes genótipos podem interferir como um precursor do aumento no risco da persistência da infecção crônica ou de doenças como cirrose e o câncer de fígado (PUJOL et al., 2009; AUNG et al., 2011; SUNBUL, 2014). Exemplificando, considera-se que as infecções agudas pelos genótipos A e D resultam em maiores índices de cronicidade do que as produzidas pelos genótipos B e C (KOBAYASHI et al., 2004; WAI et al., 2005; LIU; KAO, 2013). Os trabalhos científicos também mostram que pacientes acometidos pelos genótipos C e D apresentam menores taxas de soroconversão espontânea e precoce do HBeAg quando comparados aos genótipos A e B (LIN; KAO, 2011; RAIMONDI et al., 2010).

2.1.9 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção foi iniciado através da descoberta do antígeno australiano. Durante as décadas seguintes, foram estabelecidos ensaios sorológicos para o HBsAg e de outros antígenos virais e anticorpos dirigidos contra o VHB. Os avanços nas técnicas de biologia molecular levaram ao desenvolvimento de ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a determinação direta do DNA do vírus da hepatite B (VHB-DNA). O diagnóstico é realizado pela investigação uma série de marcadores sorológicos, o que exclui outros agentes etiológicos alternativos, como o vírus da hepatite A, C, D e E. Os testes sorológicos são utilizados para distinguir as infecções agudas autolimitadas das infecções crônicas, além de monitorar a imunidade induzida pela vacina. Estes testes também são considerados para determinar se o paciente deve partir para terapia antiviral. Os testes de ácidos nucleicos (NAT, do inglês, “*Nucleic Acid amplification Test*”) para o VHB-DNA são empregados como ensaio padrão para quantificar a carga viral e, juntamente com os antígenos e os anticorpos contra o VHB, avaliar a eficácia de agentes terapêuticos (MAUSS et al., 2017).

Outras causas de doença hepática crônica devem ser sistematicamente pesquisadas, incluindo coinfeção com VHC, VHD, VHE ou HIV (vírus da imunodeficiência humana, do inglês, “*Human Immunodeficiency Virus*”). O citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, enterovírus, fármacos hepatotóxicos e até mesmo fitoterápicos devem ser levados em conta quando apropriado para realizar o diagnóstico diferencial. Incluem, para o diagnóstico laboratorial, exames bioquímicos, imunológicos, histológicos e moleculares (BRASIL, 2008; MAUSS et al., 2017).

2.1.9.1 Ensaios Sorológicos

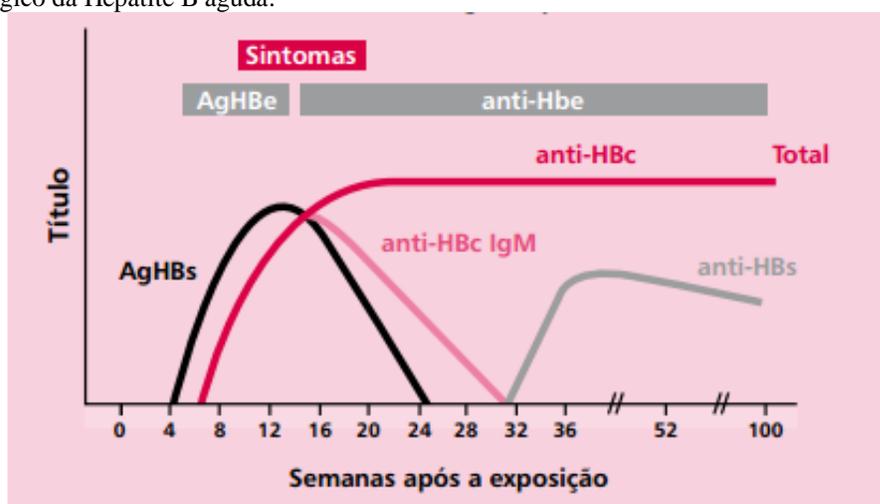
Os achados sorológicos tem relevância porque variam nas fases de evolução clínica da hepatite B. O VHB codifica três antígenos proteicos principais (HBs, HBe e HBc) contra os quais o sistema imunológico dirige a produção de anticorpos correspondentes: anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc. Os testes de sorologia para antígenos virais podem ser realizados em soro ou plasma (YANG et al., 2002). Os diferentes marcadores séricos utilizados tem importância clínica para acompanhamento da enfermidade.

2.1.9.1.1 Antígeno de superfície de hepatite B e o respectivo anticorpo

O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é o marcador laboratorial característico de infecção aguda e crônica pelo VHB. O nível do HBsAg é um reflexo da atividade transcricional viral e um indicativo do cccDNA. É um marcador importante que não apenas denota infecção ativa, mas também pode prever os resultados clínicos. Geralmente, uma metodologia bastante adotada para sua detecção é através da tecnologia de imunoensaio com micropartículas magnéticas quimioluminescentes (CMIA, do inglês, “*Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay*”). Os imunoensaios são uniformizados em relação ao padrão internacional da OMS, os quais são relativamente baratos, totalmente automatizados e expressam os títulos em unidades internacionais/mililitro (UI/mL) (MAUSS et al., 2017).

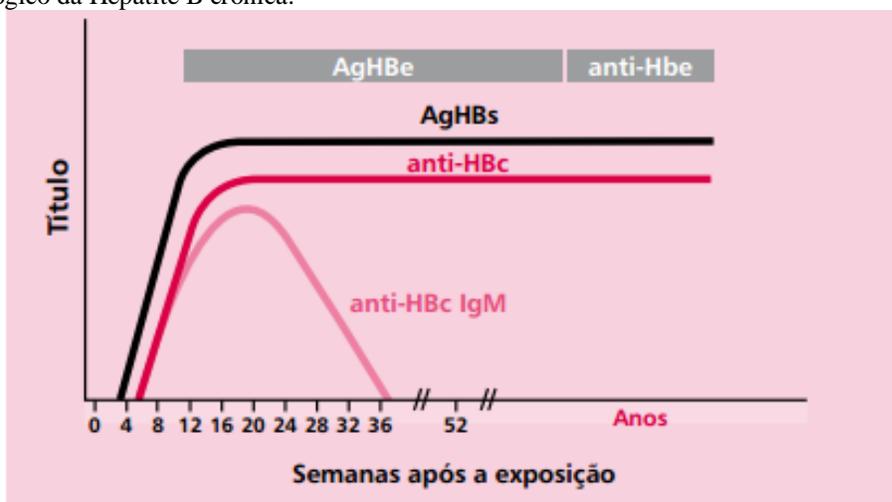
O HBsAg aparece no soro 1 a 10 semanas após a exposição ao VHB (Figura 14), antes do início da hepatite e da elevação da alanina aminotransferase sérica. Geralmente se torna indetectável após quatro a seis meses em pacientes que se recuperam do quadro agudo. Tipicamente, a persistência do HBsAg por mais de seis meses implica em infecção crônica (Figura15). Entre os pacientes com infecção crônica pelo VHB, a taxa de depuração do HBsAg é de aproximadamente 0,5 a 1 % por ano (LIAW et al., 1991).

Figura 14 - Curso sorológico da Hepatite B aguda.



Fonte: Brasil (2008).

Figura 15 - Curso sorológico da Hepatite B crônica.



Fonte: Brasil (2008).

Nos últimos anos, a quantificação dos níveis do HBsAg tornou-se muito importante. O imunoenensaio quantitativo é totalmente automatizado e têm alto rendimento. Os dois testes mais relatados para a quantificação do HBsAg sérico são: o ARCHITECT HBsAg QT (Abbott Laboratories, Abbot Park, IL, Estados Unidos) e o ELECSYS HBsAg II Quant (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Estados Unidos) (LIU; YAO, 2015). O sistema ARCHITECT é capaz de processar até 800 testes por hora e apresenta uma sensibilidade de 0,2 ng/mL num intervalo de 0,05-250 UI/mL, sendo que 1 UI/mL equivale a 1-10 ng/mL de HBsAg (CHUDY et al., 2013). Ambos conseguem detectar todas as partículas circulantes (BAYLISS et al., 2013), bem como, possivelmente, o HBsAg produzido a partir do DNA viral integrado. Os títulos de HBsAg quantitativo são mais elevados em pacientes HBeAg (+) do que em HBeAg (-) e está correlacionado com a fibrose hepática. Na hepatite B crônica com HBeAg soronegativo, níveis do HBsAg <1000 UI/mL e um título de VHB-DNA <2000 UI/mL identifica com precisão os portadores inativos (BRUNETTO et al., 2010).

Como a maioria dos ensaios do HBsAg são reproduzidos pela técnica de ELISA (do inglês, “*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*”), é necessário um equipamento de laboratório sofisticado para realizar a análise. Para permitir o rastreamento perante situações de recursos escassos e limitados, testes de diagnóstico rápido foram projetados para essa finalidade (MAUSS et al., 2017) como será visto mais adiante.

Vale pontuar que a vacinação e a administração de antivirais exercem pressões evolutivas para selecionar mutantes. Uma vez que o gene da polimerase se sobrepõe ao gene das proteínas de superfície, qualquer alteração no gene P também é alvo de variações no gene S, desencadeando na ocorrência de mutantes de escape (PICHOUUD et al., 1999). Sabe-se que na região S existe um alto grau de conservação onde se estabelece o determinante *a* (aminoácidos 120-160), formando duas hélices na face externa do HBsAg, envolvendo dois pares de cisteínas unidas por pontes dissulfídicas, comum a todos os subtipos de VHB. Uma alteração básica se dá pela troca da guanina (G) por adenina (A), substituindo a nível proteico a glicina pela arginina (Gli → Arg) na posição 145 do determinante *a* (PURDY, 2007). Este determinante passa a não ser mais reconhecido pelo anti-HBs, fazendo com que alguns testes que se utilizem desses anticorpos monoclonais não sejam capazes de detectá-lo

(LA'ULU; ROBERTS, 2006). Esses imunoenaios geralmente produzem resultados falso-negativos em pacientes infectados pela cepa mutante (COLEMAN, 2006; FOY et al., 2012) ou em pacientes com baixos níveis de HBsAg (GITLIN, 1997; ASPINALL et al., 2011).

2.1.9.1.2 *Antígeno do nucleocapsídeo vírico da Hepatite B e o respectivo anticorpo*

A princípio, o diagnóstico também pode ser firmado pela detecção do HBcAg em tecidos do fígado pela técnica de imuno-histoquímica, pois esse antígeno está presente apenas nos hepatócitos, não sendo detectado no sangue periférico. Embora seja incomum, a pesquisa do HBcAg em biópsia hepática através de exame histopatológico pode ser um útil procedimento auxiliar diagnóstico (MAUSS et al., 2017).

O anticorpo contra o core do vírus da hepatite B (anti-HBc) pode ser detectado no soro ao longo do curso infeccioso. Aparece logo depois do HBsAg após três a cinco semanas (Figura 15). Durante a infecção aguda, o anti-HBc predominante é da classe IgM, que é um importante marcador durante o período de janela imunológica entre o desaparecimento do HBsAg e o surgimento do anti-HBs. O anti-HBc IgM pode permanecer detectável por até dois anos após a infecção aguda. Além disso, seu título pode aumentar para níveis detectáveis durante episódios de exacerbações da hepatite B crônica (MARUYAMA et al., 1994). Isso pode apresentar um problema diagnóstico, sugerindo incorretamente hepatite B aguda. Outras causas comuns de agudização da hepatite B crônica são a superinfecção com o vírus da hepatite D (vírus delta) ou com o vírus da hepatite C. O anti-HBc fração IgG persiste junto com o anti-HBs em pacientes que se recuperam da hepatite B aguda (Figura 15). Ele também persiste em associação com HBsAg naqueles que progridem para infecção crônica (Figura 16) (MAUSS et al., 2017).

Pode ser o único anticorpo detectável numa fase aguda de infecção (HOOFNAGLE et al., 1974). Por ser um soromarcador de contato prévio, persiste praticamente por toda a vida, tendo sido utilizado rotineiramente na triagem de doadores sanguíneos. Além das bolsas de sangue, é contraindicada a doação de órgãos por parte de portadores anti-HBc (+) por causa do risco residual pela detecção hepática do VHB-DNA na maioria das pessoas, implicando em riscos potenciais de transmissão do vírus (FOCACCIA, 2013).

O perfil anti-HBc isolado pode ocorrer em quatro situações:

- I. Durante o período de janela da hepatite aguda após o desaparecimento do HBsAg, que é caracterizado pela predominância pronunciada de anticorpos da classe IgM;
- II. Muitos anos depois da recuperação da hepatite aguda quando o anti-HBs decai para níveis indetectáveis;
- III. Após muitos anos de infecção crônica quando os títulos de HBsAg diminuem abaixo do nível de detecção;
- IV. Resultado falso-positivo por erros clerigais e não conformidade às boas práticas laboratoriais (FOCACCIA, 2013).

A avaliação de indivíduos com esse perfil deve incluir testes repetidos para o anti-HBc, HBsAg, anti-HBe e anti-HBs. Aqueles que ainda permanecerem anti-HBc isolado devem ser testados quanto à presença do anti-HBc IgM para descartar uma infecção recente pelo VHB. Indivíduos com evidência de doença hepática crônica devem ser testados para o DNA-VHB para excluir infecção crônica de baixo nível (MAUSS et al., 2017).

É válido salientar que para se estabelecer o ponto de corte (*cut-off*) de um imunoenensaio enzimático (ELISA) para o anti-HBc de boa qualidade, realiza-se a absorbância ou densidade óptica na faixa de 450 nm. Antigamente, contudo, não se conseguia ter uma quantificação adequada e um limite de detecção absoluto. Portanto, o Instituto Paul Ehrlich (PEI, do inglês, “*Paul Ehrlich Institute*”), localizado em Langen, Alemanha, propôs alguns projetos para estabelecer adequações nos materiais de referência biológica para a OMS, onde 13 laboratórios de 10 países testaram esses materiais utilizando 30 diferentes ensaios para o anti-HBc. Por enquanto, não existe um procedimento para medição de referência internacional ao anti-HBc e a grandeza de medida não é mensurável e determinável ao Sistema de Unidade Internacional (SI) de quantidade. Todavia, uma maneira de melhorar a sensibilidade e a especificidade do teste, é transformar os sinais de concentração de UI/mL para PEI/mL, pois assim, os limites de detecção que eram baixos, resultarão em razões elevadas (a razão é conseguida ao dividir as absorbâncias da amostra pelo *cut-off* - S/CO). Assim, hoje em dia, a sensibilidade dos ensaios do anti-HBc é expressa em U-PEI/mL, calculado em cima de uma função de regressão linear (WHO, 2012).

2.1.9.1.3 Antígeno e da Hepatite B e o respectivo anticorpo

Descoberto em 1972 pelo virologista sueco Lars Magnius (MAGNIUS; ESPMARK, 1972), o antígeno e da Hepatite B (HBeAg) é uma forma secretada do HBcAg. É considerado um marcador de replicação viral e de alta infectividade (BRASIL, 2008). A soroconversão do HBeAg para o anti-HBe ocorre precocemente em pacientes com infecção aguda, antes da soroconversão do HBsAg para anti-HBs (Figura 14). No entanto, a soroconversão do HBeAg pode ser adiada de alguns anos para algumas décadas em pacientes com infecção crônica pelo VHB (Figura 15). Em tais pacientes, a presença do HBeAg é geralmente associada à detecção no soro de altos níveis do VHB-DNA e à doença hepática ativa e, conseqüentemente, a maiores taxas de transmissão do VHB (MAUSS et al., 2017). No entanto, os pacientes HBeAg reagente com infecção adquirida perinatalmente podem ter concentrações séricas normais de ALT (alanina aminotransferase) e inflamação mínima no fígado (CHANG et al., 1988).

A soroconversão do HBeAg para anti-HBe está habitualmente relacionada à diminuição no VHB-DNA sérico, mas nem todos os pacientes conseguem manter uma remissão sustentada da doença. Alguns deles continuam a ter infecção hepática ativa após a soroconversão do HBeAg. Tais indivíduos podem abrigar o VHB de tipo selvagem ou o VHB variante. Esse último alterna o códon de parada na região pré-C ou promove duas substituições nucleotídicas no promotor da região C que impede ou diminui a produção do HBeAg. A mutação mais frequente é na região pré-C onde há a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A), de TGG para TAG, no nucleotídeo 1896, induzindo à terminação prematura do antígeno “e” no códon 28, sem afetar a produção do HBcAg (CARMAN et al., 1989;

MIYAKAWA; OKAMOTO; MAYUMI, 1997; OKAMOTO et al., 1994). A principal explicação para a emergência do mutante A₁₈₉₆ provavelmente se deve a vantagem seletiva de sobrevivência no hospedeiro em comparação às cepas selvagens produtoras de HBeAg. Essa variante mais apta pode se replicar independentemente, em proporção diferente, até se tornar dominante e ser transmitida com êxito (CARMAN et al., 1989). Assim, nota-se que a hepatite crônica pode se apresentar sob dois perfis distintos: HBsAg (+)/HBeAg (+) ou HBsAg (+)/HBeAg (-).

A pesquisa do HBeAg pode ser realizada convenientemente na automação do ARCHITECT[®], projetado para ser um ensaio semiquantitativo através da razão entre amostra e *cut-off* (S/CO) (NGUYEN; DESMOND; LOCARNINI, 2009). Apresenta um intervalo razoável podendo ser modificado e otimizado como ensaio quantitativo através de um padrão externo de referência do Instituto Paul Ehrlich onde os resultados são expressos em U-PEI/mL (HEIJTINK et al., 1997; FRIED et al., 2008).

2.1.9.2 Ensaio moleculares do VHB-DNA sérico

Os testes qualitativos e quantitativos para o VHB-DNA foram desenvolvidos para avaliar a replicação viral. Atualmente, a maioria desses ensaios fazem uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, “*polymerase chain reaction*”) em tempo real. É uma metodologia ultrasensível que também exprime seus resultados em UI/mL para assegurar a comparabilidade interensaio (MAUSS et al., 2017). Tradicionalmente é a técnica padrão para identificar a infecção e estimar a quantidade inicial de DNA viral, medindo a quantidade de produto amplificado em relação ao limiar do ciclo, do inglês, “*threshold cycle*” (C_T) (PARASKEVIS et al., 2002). A PCR em tempo real apresenta um limite de detecção de 6 a 20 UI/mL (CHEVALIEZ; RODRIGUEZ; PAWLOTSKY, 2012). Ela é empregada para detectar a região altamente conservada do gene S em um intervalo de concentração que vai de 200 cópias de genoma viral por mL (0,001 pg/mL) até 2 x 10⁸ cópias/mL (HENRY, 2012).

A recuperação da hepatite B aguda é geralmente acompanhada pelo desaparecimento do DNA-VHB. No entanto, ele pode permanecer detectável no soro por muitos anos, se testado por PCR (CORNBURG et al., 2011), sugerindo que a maquinaria de replicação do vírus persiste, mas é controlada pelo sistema imunológico (infecção oculta com baixas quantidades de DNA-VHB na ausência do HBsAg).

Deve-se tomar bastante atenção para evitar a degradação do frágil ácido nucleico viral na amostra, o que pode resultar falsamente em carga viral baixa ou não mensurável. O soro deve, portanto, ser removido do sangue coagulado dentro de 4 horas após a coleta e armazenado entre -20 e -70 °C. Alternativamente, a presença de EDTA no plasma é conhecida por estabilizar o material genético. O sangue em EDTA pode ser armazenado por até cinco dias a 4 °C sem afetar a carga viral. Os testes baseados na que são rotineiramente utilizados como padrão podem usar soro ou plasma (MAUSS et al., 2017).

O DNA-VHB sérico é o marcador mais sensível e específico da replicação viral. A

quantificação do DNA-VHB (carga viral) tornou-se ferramenta-chave para a escolha do candidato para tratamento, pois a alta sensibilidade desses ensaios permite acompanhar a responsividade terapêutica de um dado fármaco em um determinado paciente. A soroconversão do HBeAg para anti-HBe é um dos objetivos mais importantes da terapia porque significa uma estagnação da enfermidade. A soroconversão do HBsAg para anti-HBs é muito mais comum naqueles que perderam HBeAg (FOCACCIA, 2013). Desse modo, em pacientes com soroconversão espontânea do HBeAg ou induzida por tratamento na hepatite crônica, os ensaios de PCR podem permanecer com detectabilidade exceto em pacientes com perda do HBsAg ou soroconversão. Devido às flutuações nos níveis do DNA-VHB, não existe um ponto de corte de viremia absoluto e único que seja confiável para diferenciar os pacientes do estado portador inativo daqueles com HBeAg (-) na hepatite crônica (CHU; HUSSAIN; LOK, 2002).

2.1.9.3 Testes laboratoriais remotos

A OMS fornece as diretrizes necessárias para desenvolvimento de testes laboratoriais remotos (TLR) para competir com os melhores ensaios de análises clínicas a fim de atender a descentralização diagnóstica frente à escassez de recursos. Segundo essas recomendações, idealmente eles precisam apresentar os seguintes critérios fundamentais: ser acessível, sensível, específico, breve, robusto, fácil de usar, além de atender a uma grande demanda com um mínimo de aparelhagem tecnológica (MABEY et al., 2004).

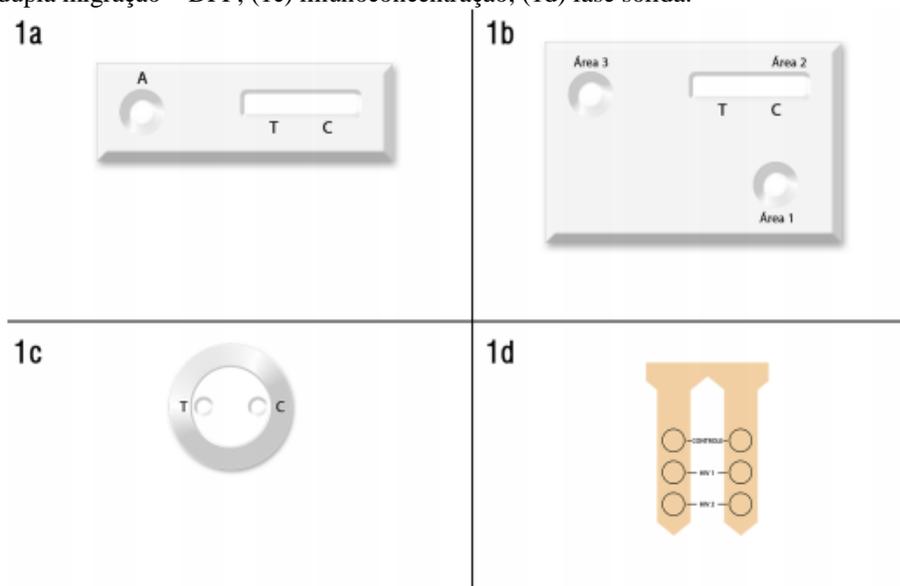
No Brasil, a Resolução RDC n. 302, de 13 de outubro de 2005, que dispõe sobre regulamento técnico para o funcionamento de laboratórios clínicos, regulariza o uso do TLR, também conhecido como teste rápido (TR), teste laboratorial portátil (TLP), teste à beira do leito ou teste ao lado do paciente, do inglês, “*point-of-care testing*” (POCT). Desde 2004, essa nomenclatura e sigla foram assim estabelecidas e recomendadas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. A definição de acordo com as Diretrizes para Gestão e Garantia da Qualidade de Testes Laboratoriais Remotos é: “teste laboratorial passível de realização em sistemas analíticos especificamente desenvolvidos de forma a permitir a sua execução em locais que podem ou não pertencer à área física licenciada pela Vigilância Sanitária como parte integrante de um laboratório clínico. Os equipamentos e insumos são em geral portáteis e de utilização simples e rápida, e os testes podem ser realizados por equipe devidamente treinada e capacitada, em qualquer local próximo ao paciente” (SUMITA et al., 2016).

Os testes padrão-ouro são operacionalmente complexos, requerem profissionais graduados, necessitam de instrumentação sofisticada e infraestrutura laboratorial apropriada para sua realização, o que elevam os dispêndios devido ao alto investimento envolvido. Os TLRs são ensaios de fácil execução, cuja leitura e interpretação analítica são feitas em, no máximo, 30 minutos com pouca ou nenhuma intervenção do operador. São sistemas autônomos fundamentais para a ampliação do acesso ao diagnóstico, sendo recomendados primariamente para testagens “*in loco*” (BRASIL, 2015). Além da mobilidade para realização de avaliações presenciais, a diminuição do tempo de espera pode ajudar a

aliviar o desconforto de certos pacientes. As vantagens significativas são que eles podem ser realizados em qualquer local, exclui o transporte de amostras para a fase analítica, dispensam a necessidade de coleta de sangue venoso, possibilitam a liberação rápida dos resultados, permitem a assistência ao paciente em uma única consulta, auxiliam na prevenção da transmissão vertical, facilitam o diagnóstico em populações-chave, promovem maiores notificações de vigilância e, aumentam a resolutividade do SUS ao facilitar, ao indivíduo, o conhecimento precoce de sua situação imunológica (SUMITA et al., 2016; HENRY, 2012).

O TLR para hepatite B é um teste para determinação qualitativa da presença do antígeno de superfície viral em soro, plasma ou sangue total. Utiliza uma combinação de anticorpos monoclonais e policlonais marcados onde o movimento de capilaridade da amostra com níveis elevados de HBsAg faz migrar os imunocomplexos formando bandas coloridas nas áreas de interpretação do ensaio. Existem vários formatos, porém o mais utilizado baseia-se na metodologia de imunocromatografia de fluxo lateral (Figura 16) (BRASIL, 2015).

Figura 16 - Exemplos de TLR para ensaios imunocromatográficos: (1a) imunocromatografia de fluxo lateral; (1b) imunocromatografia de dupla migração – DPP; (1c) imunoconcentração; (1d) fase sólida.



Fonte: [http://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22198/mod_resource/content/1/S%C3%AD filis%20-%20Manual%20Aula%207.pdf](http://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22198/mod_resource/content/1/S%C3%AD%20filis%20-%20Manual%20Aula%207.pdf)

O uso do TLR otimiza procedimentos diagnósticos e permite alcançar resultados clínicos eficientes e econômicos. Por isso, apresentam um campo de aplicação com grande potencial para revolucionar a saúde em países desenvolvidos e em desenvolvimento (YILDIZ et al., 2015). Portanto, podem se tornar no futuro uma ferramenta poderosa no cenário epidemiológico brasileiro, pois a maior parte dos indivíduos é diagnosticada na fase crônica em razão da doença se desenvolver furtivamente (BRASIL, 2015). Testes, como por exemplo, VIKIA® HBsAg, Alere Determine™ HBsAg ou DRW-HBsAg v2.0, mostraram alta sensibilidade em estudos recentes (SERVANT-DELMAS et al., 2015). A sensibilidade analítica é menor que a dos imunoenaios convencionais (SCHEIBLAUER et al., 2010), sendo desaconselhável na triagem em hemocentros, onde os pontos de corte são maiores. Apesar dos consideráveis benefícios, ainda mostram grandes limitações no desempenho analítico e cobertura de genótipos em virtude de sua simplicidade (SYEDMORADI et al., 2017).

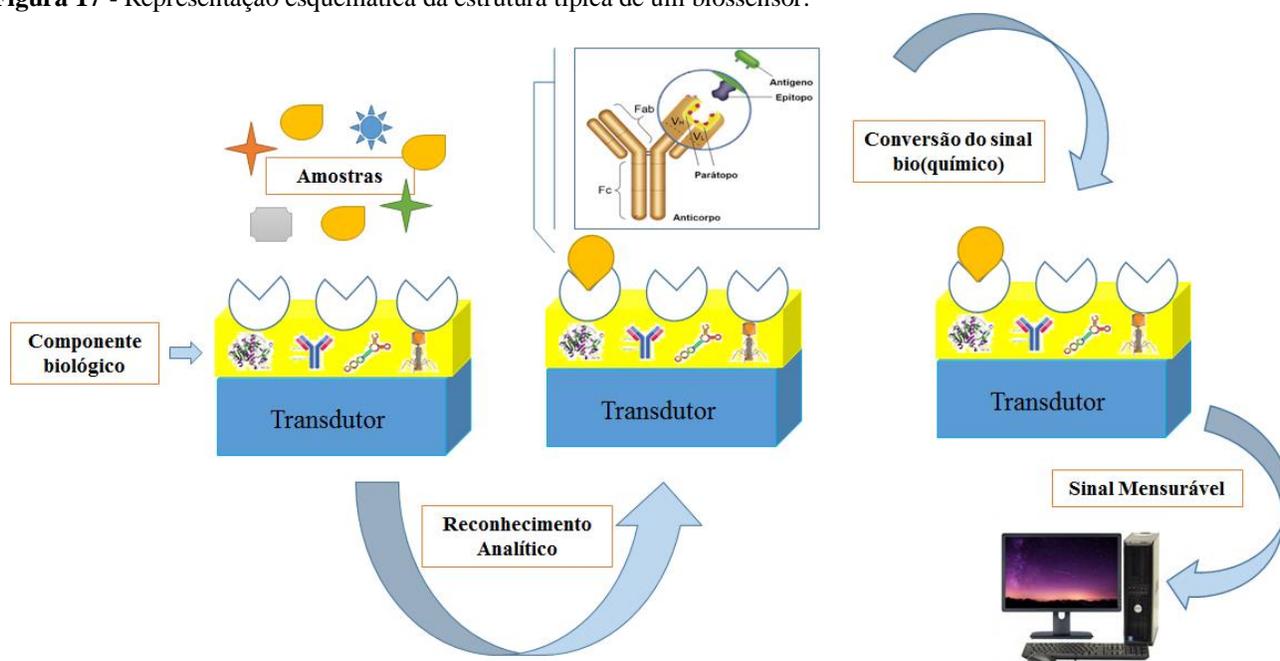
2.2 BIOSSENSORES

Dentro desse contexto, os biossensores são alternativamente outro tipo de estratégia diagnóstica econômica de testagem remota para baixos volumes de amostras em população vulnerável, fornecendo respostas imediatas com análise simplificada, porém sem a limitação no que se refere à detectabilidade (RODRIGUEZ et al., 2015). Sua origem remonta aos estudos pioneiros de Leland C. Clark, em 1956 que desenvolveram um eletrodo de oxigênio para análise das variações de concentração do analito O_2 através da medição da corrente elétrica do sistema. Essa capacidade sensora foi estudada pelos anos seguintes focando em outros gases, como na detecção de CO_2 , proposta por W. Severinghaus. Mediante a união de L. C. Clark e W. Lyons, em 1962, foi elaborado o conceito básico de biossensor. No estudo em questão, o dispositivo detectava moléculas de glicose. Outros estudiosos acabaram aprimorando esta metodologia, e em 1969, o primeiro sensor potenciométrico para detecção de uréia foi desenvolvido, utilizando uma enzima (urease) em gel de poliacrilamida, num eletrodo de vidro sensível ao amônio (NH_4). A urease apresentou elevada atividade por estar imobilizada no gel. A partir de 1972, a *Yellow Springs Instruments* foi a pioneira na comercialização de sensores, logo seguida por outras empresas que, na atualidade, produzem estes dispositivos com aplicações variadas, desde análises clínicas, passando pelo monitoramento ambiental, detecção de microrganismos na indústria alimentar, inclusive na área agrícola (RIBEIRO, 2016).

Os métodos analíticos convencionais para identificação, detecção e determinação quali e quantitativa de compostos (bioquímicos, biológicos, químicos), como gravimetria, espectroscopia de massa, Raman, fotometria, embora se mostrem precisos e sejam usados com bastante frequência, apresentam desvantagens, em sentido geral, relacionadas à análise bioquímica, tais como processos lentos, procedimentos onerosos, além da necessidade de técnicos especializados e experientes (SOARES, 2016). Além disso, a maioria dos reagentes empregados pelas técnicas tradicionais tanto em ensaios moleculares quanto em imunoenaios, como sondas de oligonucleotídeos, conjugados enzimáticos e marcadores de fluorescência, são bastante caros. Por conseguinte, há um interesse crescente pelo desenvolvimento de métodos diagnósticos novos, simples, sensíveis, confiáveis, rápidos e mais baratos. Buscando minimizar as desvantagens, a tecnologia dos biossensores para diagnóstico precoce de doenças infecciosas obteve resultados promissores devido ao seu potencial sistema de detecção reutilizável e portátil (KIZEK et al., 2015; RODOVALHO et al., 2015).

Basicamente, biossensores são dispositivos conhecidos pela capacidade de associar materiais com atividade catalítica e seletiva de reconhecimento biológico, a um conversor de sinal (transdutor). Esse último elemento, transforma a reação de reconhecimento com o analito de interesse em sinal mensurável, o qual pode ter origem elétrica, térmica ou acústica (THÉVENOT et al., 2001). Eis que estruturalmente um biossensor típico se constitui de três partes integradas: o biorreceptor, o transdutor e o sistema de processamento de sinal, (PERUMAL; HASHIM, 2014; VIDOTTI et al., 2011), o qual pode ser melhor compreendido na Figura 17.

Figura 17 - Representação esquemática da estrutura típica de um biossensor.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) liga-se de forma específica ao analito sobre uma superfície sensora, local das interações bioquímicas específicas, resultando em um sinal passível de quantificação. Este sinal é convertido e amplificado pelo elemento transdutor em um sinal elétrico, cuja magnitude é proporcional à concentração do alvo bioanalítico. Os dados são processados por um *software* e convertidos em um parâmetro significativo, que pode ser eletronicamente visualizado e armazenado (LUZ; IOST; CRESPILO, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). Diversos componentes biológicos podem ser utilizados no desenvolvimento de biossensores, baseando-se na ligação antígeno-anticorpo, hibridização de ácidos nucleicos, enzimas, etc.

Os biossensores auxiliam no diagnóstico de doenças e no monitoramento médico por meio da detecção de agentes infecciosos e de biomarcadores (SANTANA et al., 2017). A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) realiza a classificação destes dispositivos tanto pelo elemento biológico, como pela forma de transdução de sinal, ou ainda pela combinação de ambos. Quando utilizado o elemento biológico como parâmetro, terá-se um biossensor catalítico (enzimas, células ou tecidos) (LEI; CHEN; MULCHANDANI, 2006; PARK; YOON; KIM, 2010) ou de bioafinidade (antígenos, anticorpos ou oligonucleotídeos) (HIRST et al., 2008; PALCHETTI; MASCINI, 2008; TELES; FONSECA, 2008). Tratando-se do tipo de transdução de sinal, os sensores se categorizam em eletroquímicos (condutimétrico, amperométrico e potenciométrico), piezoelétricos (relacionado com a variação de massa), calorimétricos (relacionado com a variação da temperatura) e ópticos (colorimétricos, fluorescentes e luminescentes) (SOUZA, 2014).

Na atualidade, a utilização de biossensores tem apresentado grande potencial no campo da medicina diagnóstica com diversas vantagens como simplicidade de construção, miniaturização, pequeno volume de amostra, sensibilidade, rapidez, acurácia e precisão (HASAN et al., 2014; DOLATABADI; GUARDIA, 2014). O crescimento da moderna indústria eletrônica é um fator que

viabiliza a produção de biossensores integrados, de custo acessível, prontos para o uso, sendo ideais para locais com reduzida acessibilidade e centros diagnósticos de pequeno porte (SONG; XU; FAN, 2006). Nesse sentido, os eletrodos impressos abriram novos horizontes através dos testes rápidos remotos, sendo amplamente utilizados como sistemas de medição para fabricação fácil e reprodutível tanto em escala interna de laboratório quanto para produção em massa. Cada unidade sensora é basicamente composta por um esquema de três eletrodos impressos, que juntos, completam o circuito eletrônico (SYEDMORADI et al., 2017). Avanços recentes possibilitaram a impressão de camada por camada de tintas comerciais ou de fabricação própria em diferentes tipos de substratos rígidos e flexíveis (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016).

Biossensores eletroquímicos efetuam suas medidas através das alterações elétricas do meio, de acordo com parâmetros de corrente, potencial, condutividade, resistência elétrica entre outros. Para que o sinal seja captado e convertido em sinal elétrico, o elemento biorreceptor deve estar fixado sobre uma face condutora, que é chamada de eletrodo. Este eletrodo é um condutor elétrico que, em geral, é constituído por metais inertes, como ouro, mercúrio, carbono vítreo, pasta de carbono, grafite, platina, aço inoxidável, etc. Dentre os biossensores eletroquímicos, os imunossensores recentemente tem recebido uma atenção substancial e um estudo aprofundado de suas aplicabilidades.

2.2.1 Imunossensores

Partindo-se do princípio das interações bioquímicas de afinidade e especificidade que ocorre entre antígenos e anticorpos na formação de um complexo estável, tem-se a base para elaboração e construção dos dispositivos analíticos baseados em imunoenaios (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Eles são classificados como imunossensores, os quais obedecem ao mesmo princípio dos biossensores catalíticos, modificando apenas a determinação do analito, que é baseada na formação de imunocomplexos e não na reação enzimática (THÉVENOT et al., 2001; RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002). A forte afinidade que ocorre entre antígenos e anticorpos, principalmente entre ligações mono específicas, e sua associação com transdutores são parâmetros cruciais para a detecção de múltiplos analitos com alta seletividade e sensibilidade (LI et al., 2012; GOPINATH et al., 2014).

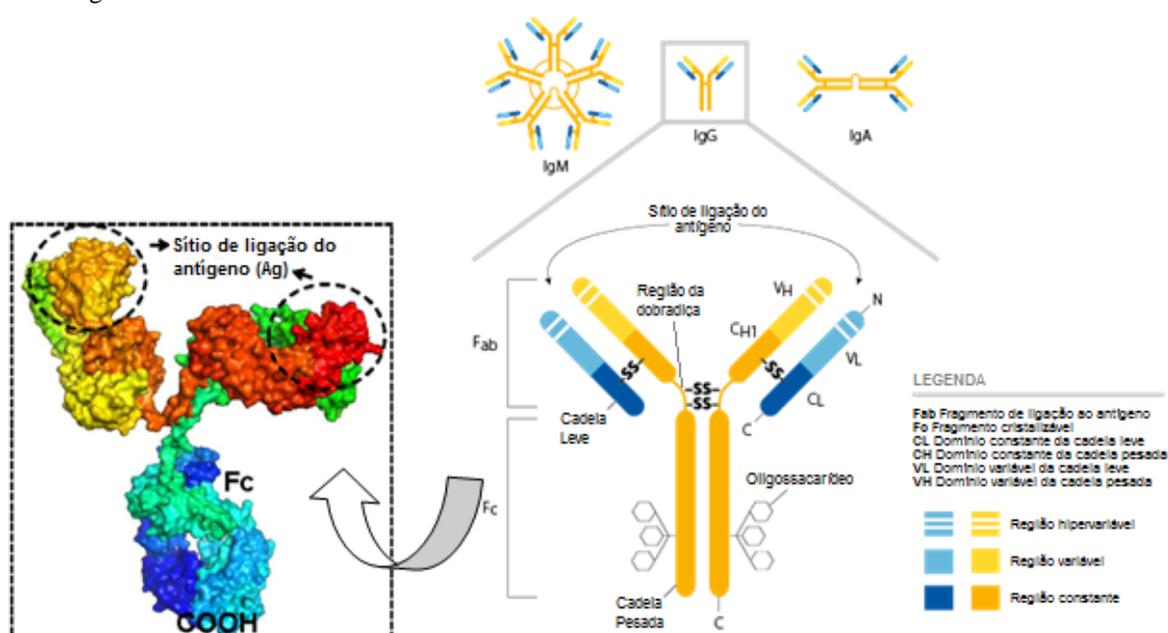
Os anticorpos são uma família natural do sistema imunológico que se encontram organizados no grupamento bioquímico das globulinas, um modelo específico de proteína responsável pela imunidade humoral. São produzidos pelos linfócitos B diferenciados em resposta ao imunógeno e desempenham um papel insubstituível no sistema imune, essencial à vida (FARKA et al., 2017). Conhecidas como imunoglobulinas, se subdividem em geral em cinco classes distintas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE), tendo a IgG como o isotipo mais abundante e com maior frequência de uso nos procedimentos imunanalíticos (ZHANG; JU; WANG, 2008).

Conforme a Figura 18, a unidade típica dos anticorpos é um heterodímero constituído por duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas de aproximadamente 50 kDa (450-600 resíduos de aminoácidos) e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas de aproximadamente 25 kDa (220 resíduos). Estas quatro cadeias estão unidas por pontes dissulfídicas e ligações não covalentes para formar uma

armação em forma de "Y". Ambos tipos de cadeias polipeptídicas consistem de arcaouços protéicos conservados chamadas domínios, correspondendo a aproximadamente 110 aminoácidos. Cada cadeia leve tem um domínio variável (DV) e um domínio constante (DC), enquanto cada cadeia pesada consiste de um DV e três DCs, no caso de IgG, IgA e IgD, ou quatro DCs, no caso de IgM e IgE (CH1, CH2, CH3, CH4). Os DVs dos braços do "Y" são regiões importantes de ligação ao antígeno, conhecidas como parátomos. Fisiologicamente, a cauda do "Y" é responsável pelo papel efector da Ig, isto é, a interação do receptor celular, a ativação do complemento, entre outros. Dessa maneira, a molécula de anticorpo pode ser dividida em duas porções principais: o fragmento cristalizável, denominado Fc, e o fragmento de ligação ao antígeno, chamado F(ab) (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). A porção Fc possuem grupamentos carboxílicos que são utilizados para permitir uma imobilização orientada dos anticorpos à superfície sensora deixando os sítios de ligação ao antígeno livres (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

O princípio da transdução de sinal em imunossensores se baseia na medida de uma corrente elétrica 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 ET é mensurada e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas (SILVA, 2014).

Figura 18 - Esquema representativo e a própria estrutura molecular da imunoglobulina G. O arcaouço proteico em forma de "Y" é constituído por quatro unidades polipeptídicas unidas, duas cadeias maiores idênticas e duas cadeias menores idênticas. Os braços consistem das extremidades N-terminal das cadeias leve e pesada associadas. A cauda é formada pela combinação das extremidades C-terminal das cadeias pesadas. As ligações dissulfídicas são relevantes para distinguir a maioria das subclasses de IgG.



Fonte: Adaptado de Gopinath (2014).

Em biossensores eletroquímicos com imunoglobulinas acopladas, as espécies biológicas alvo são reconhecidas por anticorpos imobilizados no ET e sua interatividade pode prejudicar a mobilidade de carga, produzindo resistência elétrica. 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, a qual assemelha-se ao imunoenensaio enzimático. Assim, o antígeno ou o anticorpo podem ser marcados por engenharia genética ou por modificações químicas com fluoróforos, partículas magnéticas, *quantum dots* ou enzimas, sendo conhecidos como conjugados, ou seja, uma molécula que se liga ao alvo para revelar a presença ou identificar atividade molecular. No entanto, o evento dessa ligação pode alterar as características conformacionais dos ligantes. A medida da corrente será correlacionada em função da constituição dos imunocomplexos. Há diversas pesquisas que relatam o uso de marcadores na identificação de analitos de interesse, porém na atualidade, a análise seletiva de biomoléculas na ausência de marcadores tem crescido consideravelmente porque métodos de detecção livre de marcação conseguem obter informações através das características biofísicas moleculares (ZAREI, 2017; DIAS et al., 2013). Esse modelo de biossensor oferece vantagens inerentes como redução nos resultados falso-positivos, custo reduzido de análise, detecção em tempo real e redução de etapas de manipulação.

Existem vários trabalhos da literatura científica que abordam sobre o desenvolvimento de imunossensores para a hepatite B. Mesmo com a quantidade de soromarcadores, as buscas tem se concentrado naqueles de surgimento inicial da infecção. A maioria das pesquisas tem tratado da quantificação do HBsAg e escassos são os relatos visando a detecção do Anti-HBc. Exemplificando esses casos, recentemente tem-se consolidado o biossensoriamento ultrasensível via imunoenensaio eletroquímico para o antígeno de superfície viral utilizando nanopartículas de platina (LI et al., 2015), nanopartículas de ouro (SABOURI et al., 2014), nanopartículas magnéticas (ALIZADEH; HALLAJ; SALIMI, 2017), nanobastões (LI et al., 2018), nanotubos de carbono (QIU; HUANG; LIANG, 2011). Por ser um anticorpo do hospedeiro, o Anti-HBc não sofre mutações a ponto de não ser mais reconhecido pelos ensaios imunológicos. Logo, esse aspecto além dos outros pontos advogados ao longo da tese evidenciam a importância do seu impacto clínico e por esse motivo, tornou-se o marcador de escolha para este trabalho.

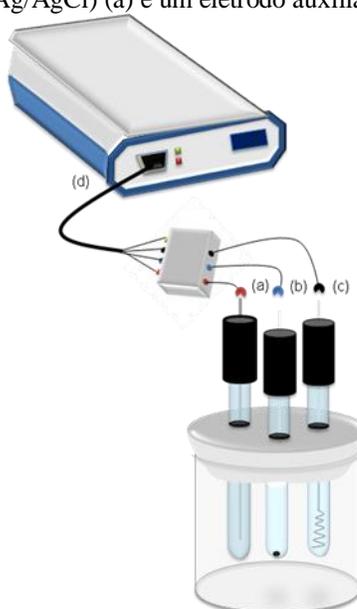
2.2.2 Técnicas eletroquímicas

O principal objetivo da eletroquímica é avaliar 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 durante a etapa de transdução. Quando um sensor é introduzido em uma solução contendo moléculas alvo, a ligação específica entre o elemento de reconhecimento e as moléculas alvo altera as propriedades elétricas que por sua vez podem ser monitoradas através de técnicas de leitura eletroquímica (GRIESHABER et al., 2008).

Um exemplo de processo eletroquímico é uma reação química geradora de um fenômeno elétrico, como uma pilha ou um fenômeno elétrico que induz a uma reação química como um processo de eletrodeposição. Nesse processo são medidas as alterações de corrente, potencial, condutância, impedância, capacitância, entre outras. Os experimentos são realizados dentro de uma célula eletroquímica (Figura 19), que se compõem de três eletrodos: o ET, onde ocorrem os processos

eletroquímicos de interesse; o contra eletrodo ou eletrodo auxiliar (EA), utilizado para descarga de sobrepotência; e o ER, que mantém a diferença de potencial em relação ao ET. Através do uso de uma fonte de energia externa, uma voltagem pode ser aplicada aos eletrodos para modular a energia dos elétrons. Um potenciostato é usado para controlar o potencial aplicado do ET em função do potencial do ER. Dependendo do tipo de material do ET, diferentes janelas de potencial serão fornecidas para acesso. A corrente é registrada como fluxo de elétrons entre o ET e o EA. Um fio de platina ou disco é normalmente usado como eletrodo auxiliar. Para garantir que a cinética da reação que ocorre no contra eletrodo não iniba aquelas que ocorrem no ET, é necessário que sua área de superfície seja consideravelmente maior (ELGRISHI et al., 2018).

Figura 19 - Sistema eletroquímico conectado ao potenciostato (d) constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (Ag/AgCl) (a) e um eletrodo auxiliar (fio de platina) (c).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A técnica eletroquímica é uma importante ferramenta que oferece opções viáveis para mediar problemas na elaboração de novos métodos diagnósticos, podendo avaliar as modificações de superfície. Apresenta em suas vantagens, a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises e facilidade no controle de variáveis como particularmente conduzidas pela voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (VPD), dentre outras (BARD; FAULKNER, 2001; SANTOS, 2012; CABRAL, 2014; MENEZES, 2014).

2.2.2.1 Voltametria cíclica

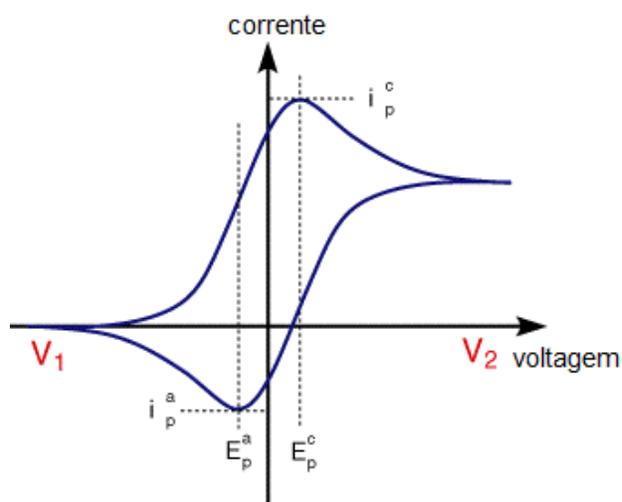
A voltametria é uma técnica eletroanalítica na qual as informações sobre o analito são mensuradas através da análise das variações de corrente resultantes de reações de oxidação e redução após aplicação controlada de uma diferença de potencial. Neste processo, uma corrente capacitiva é gerada, correspondendo às alterações na dupla camada do eletrodo após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes farádicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox na superfície sensora. Este processo obedece à lei de Faraday, a qual

determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na superfície do eletrodo é proporcional à corrente (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006). Embora seja pouco utilizada em análises quantitativas, a técnica de VC é muito empregada para obtenção de informações sobre os processos eletroquímicos, como reações redox, detecção de intermediários de reações, observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos, etc. Geralmente, é a primeira técnica selecionada na investigação de um sistema que contém espécies eletroativas, uma vez que indica o potencial redox destas espécies (HARRIS, 2005; SKOOG et al., 2006).

A resposta em corrente neste método é obtida quando se submete o ET a uma onda triangular de potencial controlado, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada em função do potencial aplicado. Obtém-se como resposta a essa perturbação, um par de picos catódico e anódico registrados em uma curva voltamétrica, denominada voltamograma cíclico (Figura 20), no qual se relaciona a variação da corrente (eixo y) vs. a variação de potencial (eixo x). Os principais parâmetros analisados em um 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}). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons (BARD; FAULKNER, 2001; HOLLER et al., 2009).

Na construção de testes diagnósticos, esta técnica se mostra importante 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, 2014; CABRAL, 2014).

Figura 20 - Parâmetros obtidos de um VC: potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa}), correntes de picos catódicos e anódicos (I_{pc} e I_{pa}).



Fonte: Adaptado de Bard e Faulkner (2001).

2.2.2.2 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) tem recebido crescente atenção como uma técnica voltamétrica rápida e sensível para análises quantitativas de rotina. É considerada uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é 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 (SOUZA et al., 2004). A tabela 1 apresenta a forma de aplicação do potencial da VOQ e os voltamogramas esquemáticos de um processo redox de um sistema reversível.

2.2.2.3 Voltametria de 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 da aplicação do pulso e no final do mesmo 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, são plotadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com 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; MACHADO; AVACA, 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 tabela 1 apresenta a visualização gráfica desta voltametria.

Tabela 1 - Outros tipos de técnicas voltamétricas. Os pontos indicam o momento em que a corrente é medida. A resposta de corrente é para a redução de um par redox reversível.

Técnica	Forma de onda potencial	Resposta de corrente
Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)		
Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)		

Fonte: Adaptado de Zoski (2007).

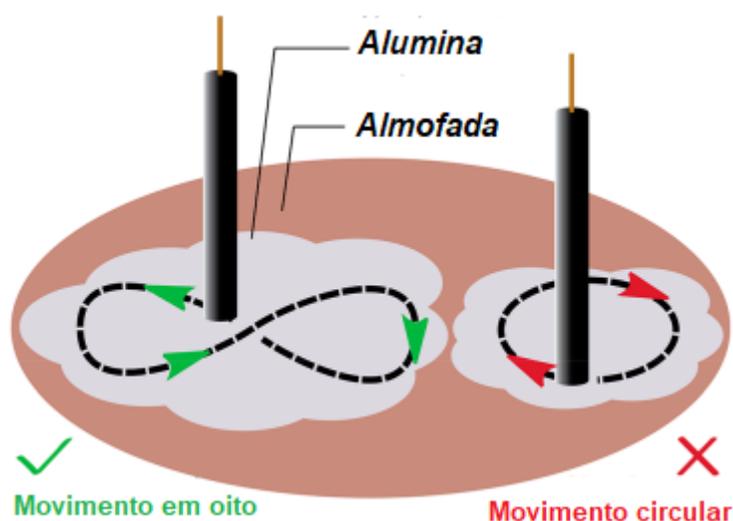
2.2.3 Seleção eletródica e limpeza eletroquímica

O primeiro passo para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico é a seleção da superfície eletródica. Selecionar um eletrodo é fundamental para a sensibilidade do método, para o custo do ensaio e para a possibilidade de adotar diferentes procedimentos de imobilização de um receptor bioquímico. Como já mencionado, os eletrodos normalmente usados são feitos de metais inertes, como platina, ouro e variantes do carbono, incluindo fibra de carbono, epóxi grafite, grafeno e carbono vítreo (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012). Logo, graças às propriedades físicas e químicas, o carbono vítreo é um material carbonáceo interessante, resistente à corrosão e amplamente aplicável. Exibe uma taxa de oxidação bastante baixa e uma inércia química bastante alta que, juntamente com os pequenos tamanhos de poros e uma pequena permeabilidade a gases e líquidos, tornam o carbono vítreo um eletrodo inerte conveniente e superficialmente modificável (VAN DER LINDEN; DIEKER, 1980).

Eletrodos convencionais não são destinados para uma única utilização. A superfície de um eletrodo clássico pode ser regenerada e usada várias vezes quando lavados e limpos com bastante cuidado (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012). Por isso que é recomendado que eles sejam submetidos a procedimentos de pré-tratamento de superfície antes do uso imediato em cada experimento, utilizando métodos para remover contaminantes vestigiais e impurezas analíticas (BOTT, 1997). O polimento garante que não exista espécies indesejáveis na superfície do eletrodo que possam inibir a transferência de elétrons. Durante o manuseio é necessário certificar que não haja a formação de bordas ou ranhuras irregulares na superfície. Utilizar uma almofada aveludada ou um pano macio embebido com suspensões de pós abrasivos é um método de remoção física bastante comum e efetivo

para a limpeza eletroquímica. A alumina (Al_2O_3) desaglomerada, um excelente óxido cerâmico, compreende partículas comercialmente disponíveis do tamanho micron e submicron, e tradicionalmente adequase-se para esta finalidade, haja vista que o uso de grandes partículas pode deixar arranhões. O polimento mecânico deve ser executado na forma de um 8 sob condição plana a fim de evitar corrosão do eletrodo abaixo do nível do plástico de suporte (Figura 21). Em seguida, o mesmo deve ser extensivamente lavado com água destilada e sonicado em solução aquosa. O enxague e a sonicção retiram as partículas residuais que tenham ficado adsorvidas na superfície do eletrodo (BOTT, 1997; ELGRISHI et al., 2018; GRAHAM, [s.d.]).

Figura 21 - Limpeza eletroquímica por polimento mecânico. A alumina adicionada ao bloco de polimento forma uma pasta e sobre ela, a face do electrodo de trabalho deve ser esfregada da maneira mais plana possível. Padrões de movimento em 8 são recomendados porque tendem a não desenvolver ranhuras e a superfície do eletrodo torna-se originalmente espelhada. Ao se utilizar movimentos circulares, o polimento é irregular e a superfície pode ficar inclinada devido ao desgaste por atrito de forma desigual.



Fonte: Adaptado de Elgrishi (2018).

Um ET bem polido produz uma superfície lisa com alto grau de ativação e é essencial para coletar dados confiáveis e reprodutíveis durante as medições. Os perfis modificado e não modificado podem ser caracterizados por voltametria cíclica em sondas eletroquímicas, escolhendo diferentes taxas de varredura numa determinada faixa de potencial. A leitura pode ser baseada na condução iônica por indicadores redox tal como o ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (NOEL; ANANTHARAMAN, 1985; DEKANSKI et al., 2001). O estado de superfície e o grau de ativação de um eletrodo de carbono vítreo podem ser avaliados ao examinar o afastamento dos potenciais dos picos de oxidação e redução. A diferença entre os potenciais de pico redox no perfil não modificado deve ser próximo ao valor teórico de 60 mV (SRIKANTH RANGANATHAN; TZU-CHI KUO; MCCREERY*, 1999; GRAHAM, [s.d.]).

2.2.4 Modificação da superfície eletródica

O processo fundamental nas reações eletroquímicas é a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as moléculas na região interfacial, ou seja, as moléculas em solução ou imobilizadas na superfície do eletrodo. A cinética deste processo heterogêneo pode ser

significativamente afetada pelo polimento. Este método altera tanto a microestrutura e rugosidade da superfície eletródica quanto bloqueia os sítios ativos na mesma superfície por materiais adsorvidos (BOTT, 1997).

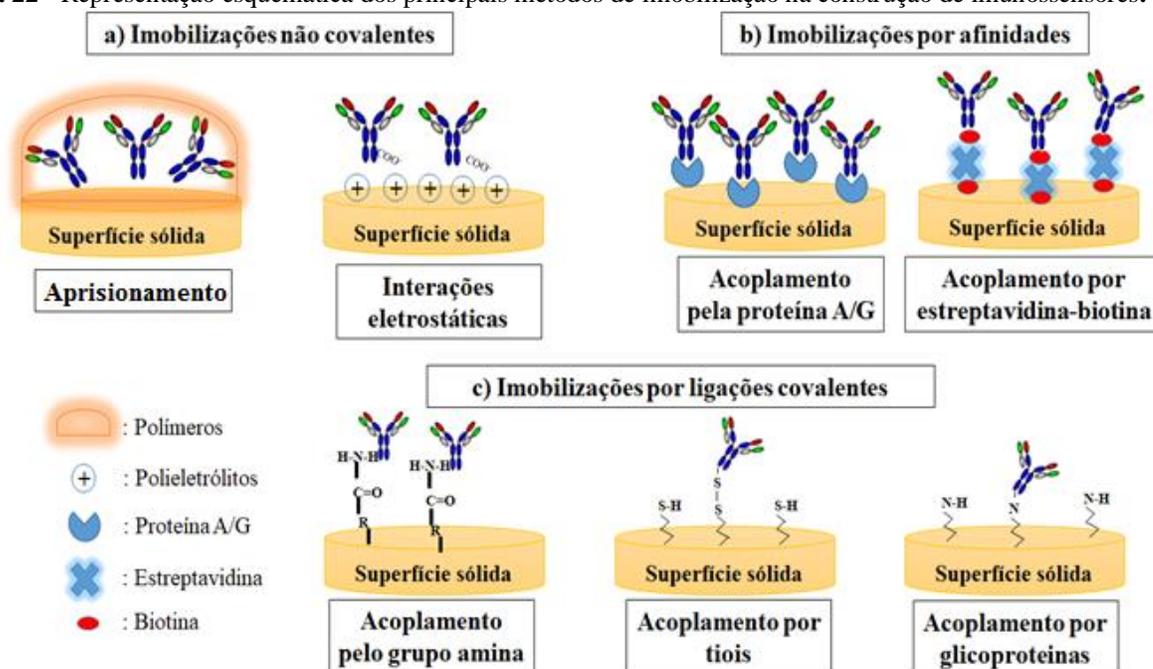
Após dedicar esforço para o preparo e garantir uma boa limpeza eletroquímica, a próxima etapa consiste no recobrimento da base sensora por monocamada ou policamadas de um modificador químico. Agentes modificadores disponibilizarão espécies quimicamente ativas ao serem deliberadamente imobilizadas em sua superfície com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Isso permite alterar a reatividade e seletividade possibilitando o desenvolvimento de dispositivos com vários propósitos e aplicações (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). Modificações da superfície eletródica com respostas de corrente aumentadas trazem consigo um alto desempenho analítico do biossensor, porque alarga a área de superfície, ampliando ainda mais o sinal detectável e, diminuindo, conseqüentemente, o limite de detecção (OLIVEIRA et al., 2013; GOYAL; BISHNOI, 2012).

2.2.5 Métodos de imobilização

Para otimizar a imobilização e direcioná-la para uma aplicação específica, torna-se necessário ajustar a hidrofobicidade, a condutividade e as funcionalidades reativas de modificação a fim de incorporar moléculas bioativas hidrofílicas com sucesso (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Com base nisso, a imobilização direcionada e a estabilização operacional de receptores biológicos ativos no transdutor constituem passos centrais. É fundamental manter a atividade biomolecular, melhorar a estabilidade estrutural e assegurar a acessibilidade do analito para os eventos biológicos. Existem estratégias adequadas de bioconjugação sobre os eletrodos para materiais abióticos (polímeros molecularmente impressos, éteres coroa sintéticos) e materiais bióticos (ácidos nucleicos, proteínas, aptâmeros, lectinas, organelas, células, tecidos animal/vegetal). As técnicas de imobilização são classificadas em métodos reversíveis e irreversíveis (HERMANSON, 2013), sendo ilustradas na Figura 22 e resumidas na tabela 2.

Materiais fixados reversivelmente podem ser dissociados do suporte sólido sob condições suaves. Técnicas reversíveis são altamente atrativas, principalmente por razões econômicas. Depois de usar o suporte, o mesmo pode ser regenerado e recarregado com um novo bioreceptor. Os métodos mais comuns de imobilização reversível são a adsorção e a bioafinidade. A imobilização é irreversível quando o bioreceptor ligado ao suporte não pode ser despreendido em solução após o uso, sem levar a destruição da funcionalidade biológica ou a integridade do suporte. Os métodos mais usuais de imobilização irreversível são a ligação covalente, reticulação e aprisionamento ou micro-encapsulamento (LIEBANA; DRAGO, 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

Figura 22 - Representação esquemática dos principais métodos de imobilização na construção de imunossensores.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentro da abordagem não covalente, a adsorção é um processo leve e fácil de adesão direta não específica, que é baseada principalmente na adsorção física ou na ligação iônica. Na adsorção física, os biorreceptores são ligados à superfície através de ligação de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas, enquanto que na ligação iônica se dá por forças eletrostáticas. Na bioafinidade, moléculas complementares são utilizadas para realizar a interatividade, como lectina-açúcar, anticorpo-antígeno, biotina-avidina, e, as proteína A e G com IgGs de mamíferos. A associação entre a biotina (vitamina H) e avidina (glicoproteína encontrada na clara do ovo) é a mais forte interação não covalente conhecida, tornando esse complexo extraordinariamente útil na química de bioconjugação. A única desvantagem do uso da avidina é a sua tendência a ligar-se de forma não específica a outros componentes além da biotina. Esse sistema é um procedimento bem simples e resistente, sendo altamente estável ao longo de um amplo intervalo de pH e temperatura, não sendo afetada pela maioria dos solventes orgânicos e agentes desnaturantes. Isso fornece uma intensa ligação, reduzindo a necessidade de reagentes químicos. Além da avidina, a biotina também pode se ligar à estreptavidina e à neutravidina (LIEBANA; DRAGO, 2016; AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016).

Na abordagem covalente o objetivo é alcançar altos níveis de atividade biológica, por isso a área ativa da biomolécula imobilizada não deve ser comprometida pela química de ligação ao suporte. Por exemplo, os epítomos, resíduos de aminoácidos essenciais para reconhecimento de anticorpos, não devem sofrer impedimento estérico ou alteração conformacional. Uma ampla variedade de reações foi desenvolvida dependendo dos grupos funcionais envolvidos. Um pequeno número de grupos funcionais compreende os alvos selecionáveis para métodos práticos de bioconjugação, a saber: amins primárias, grupos carboxílicos, tiois, carbonilas e carboidratos. A reticulação é o processo de unir duas ou mais moléculas por uma ligação covalente utilizando agentes de reticulação, ou seja, reagentes que contem duas ou mais extremidades reativas capazes de se ligarem quimicamente aos grupos funcionais específicos mencionados acima para uma imobilização estrategicamente orientada, no entanto,

requerendo um maior tempo de reação (LIEBANA; DRAGO, 2016; GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Por fim, o método de aprisionamento físico é baseado no confinamento de uma biomolécula dentro de uma rede polimérica ou envolto numa matriz gelificada. A oclusão molecular em polímeros eletrogerados acaba restringindo a contaminação e deteriorização (OLIVEIRA et al., 2013).

Toda modificação da superfície eletródica no desenvolvimento dos imunossensores intencionalmente pretende alcançar propriedades especialmente novas e interessantes como reprodutibilidade, confiabilidade, sensibilidade (OLIVEIRA et al., 2013), com maiores interações biomoleculares (KANG; YANG; CAI, 2008; DUNG et al., 2012) e maior cinética de transferência de elétrons (TUNCER et al., 2012). Porém, concomitantemente, almeija-se também obter a estabilidade de prateleira. O tempo de estocagem e a facilidade de armazenamento são requisitos primordiais que são conseguidos pela retenção da atividade proteica à longo prazo. Caso, os biorreceptores sofram lixiviação da interface sensora durante um período curto de tempo, isso implicará em uma rápida perda significativa de sinal, reduzindo a vida útil dos dispositivos. Dos métodos descritos acima, o método de imobilização mais comum usado em transdutores de carbono pré-ativado é o acoplamento covalente explorando os grupos amina e carboxílico (LIEBANA; DRAGO, 2016).

Tabela 2 - Principais características das diferentes técnicas de imobilização.

Método de Imobilização	Tipo de Interação	Princípio da Interação	Vantagem	Limitação
Adsorção	Reversível	Pontes de hidrogênio, forças de Van Der Waals, ligações hidrofóbicas e forças eletrostáticas	Simplicidade, agilidade, baixo custo	Baixa reprodutibilidade, orientação aleatória, baixa estabilidade
Bioafinidade	Reversível	Acoplamento de alta afinidade por moléculas complementares	Boa orientação; alta especificidade, seletividade e funcionalidade	Custo, complexidade
Bioconjugação	Irreversível	Ligação covalente através de reações químicas entre grupos funcionais	Estabilidade, alta força de ligação	Custo, complexidade, processo demorado
Reticulação	Irreversível	Ligação covalente de grupos funcionais não ativos a grupos reativos	Estabilidade, robustez	Complexidade, toxicidade do agente reticulador
Aprisionamento	Irreversível	Confinamento dentro de um filme polimérico durante a eletropolimerização	Simplicidade, agilidade, estabilidade	Impedimento estérico, orientação inespecífica

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.6 Nanomateriais

A modificação da superfície sensora pode ser realizada pela imobilização de nanomateriais em associação com os polímeros condutores, os quais auxiliam no aumento da condutividade elétrica (SPAIN et al., 2011; KAFI; CROSSLEY, 2013; LU et al., 2014). A integração de nanomateriais com biomateriais resulta em novos nanobiomateriais híbridos com atributos e funções sinérgicas. A compatibilidade de tamanho com a bioescala propicia oportunidades excepcionais para o controle e monitoramento de processos biológicos, além de permitir o rápido progresso para detecção, terapia e prevenção de doenças. A maioria dos processos biológicos envolve interações eletrostáticas e transferência de carga, que podem ser diretamente detectadas por dispositivos eletrônicos baseados nos materiais nanométricos. (DOLATABADI; GUARDIA, 2014). O ingresso desses nanomateriais atuando como transdutores de sinais contribuíram para desenvolver novas ferramentas de investigação de biomarcadores. Por consequência, uma nova divisão de biossensores denominada nanobiossensores foi adquirida por combinar as vantagens dos nanomateriais a fim de proporcionar um comportamento analítico melhorado (GUPTA; MURTHY; PRABHA, 2018).

Através do efeito quântico, materiais na nanoescala exibem propriedades fascinantes, não sendo observados aos seus equivalentes maciços. Efeitos de superfície são manifestados com a diminuição do tamanho devido ao aumento da razão entre sua área e seu volume, pois todos os átomos na superfície tornam-se disponíveis para participar de interações físicas e químicas. Os nanomateriais são formados por nanoagregados de partículas ultrafinas de dimensões nanométricas localizadas na região de transição entre moléculas e estruturas microscópicas. Podem ser definidos com base em parâmetros de tamanho, sendo menores de 100 nm em, pelo menos, uma de suas dimensões (MAMANI, 2009).

Como os materiais nanoestruturados podem ser incluídos em passos subsequentes sobre o ET, são frequentemente incorporados por adesão ou ligação às plataformas de suporte, modificando-as de forma bem robusta (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014). Eles são usados para melhorar a eficiência de imobilização de biomoléculas e acelerar a taxa de transferência de carga na superfície sensora, além de otimizar a mediação eletroquímica para amplificar fortemente os sinais (SYEDMORADI et al., 2017). Vários desses nanomateriais tem contribuído para o desenvolvimento de imunossistemas eletroquímicos. Os mais comumente empregados são as nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxidos metálicos, nanossílica, nanofios, nanotubos, grafeno, pontos quânticos e seus correspondentes nanocompósitos (DOLATABADI; GUARDIA, 2014; KRISHNA et al., 2013).

2.2.6.1 Nanopartículas metálicas

Nanomateriais metálicos tem despertado interesse devido às suas propriedades ópticas e eletrocatalíticas exclusivas. Além de garantir o acoplamento de bioreceptores, as nanopartículas metálicas podem atuar como veículos de condução eletrônica, as quais permitem que os elétrons produzidos nas bioreações sejam transportados aos eletrodos ou então, converter as mudanças físicoquímicas em sinais mensuráveis proporcionais à concentração do analito (LI; SCHLUESNER; XU, 2010). Nanoestruturas metálicas têm sido consideradas em sistemas de marcação quando ligados a

anticorpos secundários para desenvolver a estratégia de amplificação de sinal em imunossensores eletroquímicos (MALEKZAD et al., 2017).

2.2.6.1.1 *Nanopartículas de ouro*

O ouro é um metal inerte na macroescala, mas as nanopartículas de ouro são nanomateriais adotados frequentemente explorados para melhorar um sinal adequado. A mudança de cor é observável a olho desarmado. Esta propriedade óptica da revelação na cor visível é valiosa especialmente em ensaios colorimétricos (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014). Apesar de apresentarem um custo superior, apresentam alta condutividade, excelente biocompatibilidade, grande estabilidade, baixa toxicidade, produção e modificação relativamente simples (LI; ZHAO; ASTRUC, 2014). Por isso, nanopartículas de ouro coloidal também têm sido utilizadas para modificar eletrodos sólidos, pois mostraram vantagens na ancoragem de imunocomponentes e na transferência de elétrons, aumentando os sinais eletroquímicos. A forte afinidade pelos grupos amino pode ser explorada onde o ouro fornece um microambiente compatível com biomoléculas, assegurando sua atividade mesmo após a imobilização (INCI et al., 2015). Além disso, elas ajudam a moldar o anticorpo nas proximidades do antígeno resultando no aumento da sensibilidade até o nível do femtograma (KUMAR et al., 2015).

2.2.6.1.2 *Nanopartículas de prata*

A prata é um metal nobre relativamente barato que exibe propriedades superiores ao ouro na escala nanométrica, principalmente de natureza ótica (EL-DESSOUKY; GEORGES; AZZAZY, 2012). Por conveniência, nanopartículas de prata são predominantes em ensaios colorimétricos pela simples discriminação de mudança de cor. Elas podem ser oxidadas mais facilmente e oferecem melhor atividade eletroquímica. A utilização tanto isolada ou conjugada como elementos de transdução de sinais para investigação de analitos melhorou os limites de detecção e o desempenho diagnóstico em imunossensores (FARKA et al., 2017). Para isso, elas precisam estar associadas a moléculas de reconhecimento que possam detectar e capturar seletivamente o analito de interesse. No entanto, a funcionalização ainda é um processo desafiador. Nanoestruturas de prata são menos estáveis em dispersões aquosas e estão suscetíveis à oxidação e corrosão por íons cloreto. Devido sua limitada estabilidade e dificuldade para funcionalizar, tornaram-se menos populares (EL-DESSOUKY; GEORGES; AZZAZY, 2012).

2.2.6.1.3 *Nanopartículas magnéticas*

As nanopartículas magnéticas são, comparativamente, mais baratas de se sintetizar, sendo consideradas fisicamente e quimicamente estáveis, biocompatíveis e ambientalmente seguras. Apresentam certas peculiaridades para aplicações em biosensores eletroanalíticos como ausência de um estágio de pré-processamento para purificação de amostras, uma vez que as moléculas biológicas não mostram qualquer comportamento ou suscetibilidade magnética e, portanto, nenhuma interferência ou ruído é esperado durante a captura do sinal (HAUN et al., 2010). Uma utilidade promissora é a pré-

concentração magnética antes do evento de detecção, pois conjugadas com uma unidade bioreceptora podem ser simplesmente misturadas em solução para interagir especificamente com o analito. Elas oferecem a conveniência da separação através de um campo magnético externo, permitindo que sejam facilmente atraídos por um pequeno ímã e perdendo seu efeito magnético quando o campo é removido. Dessa forma, essas nanoesferas podem ser eficientemente separadas (FARKA et al., 2017).

No entanto, a principal estratégia é a integração das nanopartículas magnéticas no elemento transdutor ou modificando a superfície sensora. Apesar da disposição de uma ampla gama de materiais ferromagnéticos, os óxidos de ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4) são mais comumente usados para geração ou amplificação do sinal analítico (HAUN et al., 2010). Empregando métodos adequados de funcionalização, alguns benefícios podem ser alcançados como análise rápida do processo, melhor estabilidade e baixo limite de detecção. Além disso, são considerados alternativas fluorescentes que oferecem facilidade de manipulação e baixo custo de produção quando comparado aos fluoróforos (SYEDMORADI et al., 2017).

2.2.6.2 Alótropos de carbono

O carbono é um dos elementos mais abundantes encontrados na crosta terrestre, fornecendo variedades alotrópicas, as quais cada uma delas provou ser útil para a humanidade (BHARECH; KUMAR, 2015). A contribuição dos alótropos na construção de imunossensores eletroquímicos ganhou ênfase devido ao pequeno tamanho desses átomos de carbono e ao número de elétrons que eles podem compartilhar, permitindo a formação de vários padrões de ligação e de materiais versáteis estáveis com excelentes propriedades intrínsecas tais como condutividade elétrica, grande área de superfície, facilidade de funcionalização e biocompatibilidade (WANG; DAI, 2015).

2.2.6.2.1 Grafeno

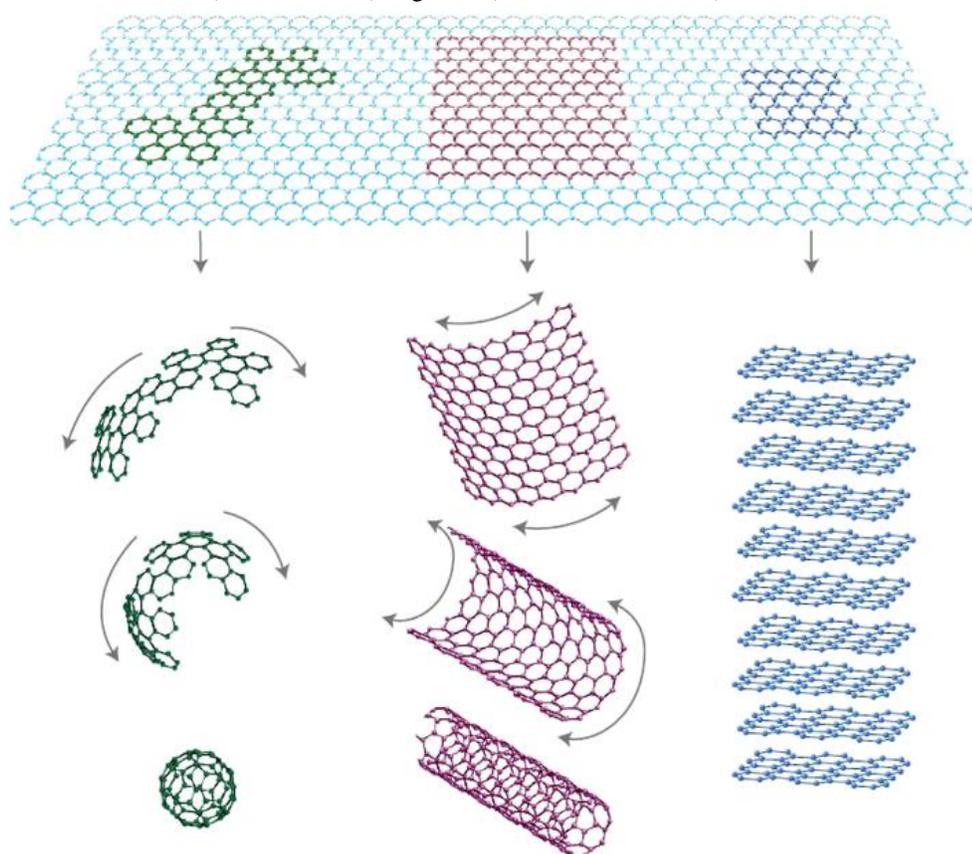
O grafeno é considerado um proeminente nanomaterial predecessor de todas as formas gráficas. É um material bidimensional de espessura atômica regular, originado por átomos de carbono densamente empacotados, formando uma estrutura de padrão hexagonal semelhante a uma colmeia (Figura 23). A caracterização e identificação do grafeno foi realizada pela primeira vez em 2004, através de etapas sucessivas de esfoliação com grafite utilizando fitas adesivas comerciais (YAO et al., 2012). Essencialmente é o próprio modelo para os demais alótropos de carbono, como fulereno, nanotubos, grafite, nanofitas e outros (ZHANG; ZHOU; ZHAO, 2010). Ele é uma folha muito fina, mais forte do que o aço, sendo, por isso, incrivelmente leve, pesando apenas $0,77 \text{ mg/m}^2$. Possui uma transparência óptica tremendamente alta de até 97,7% (RACCICHINI et al., 2015; BHARECH; KUMAR, 2015).

Cada átomo de carbono está ligado a outros três átomos devido à hibridação sp^2 . Isso acaba permitindo um elétron disponível livremente na terceira dimensão para transporte de carga, o que faz apresentar uma mobilidade eletrônica extremamente elevada, quase independente às variações de temperatura (BHARECH; KUMAR, 2015). Essa supercondutância do grafeno é cerca de 60 vezes maior que a dos nanotubos de carbono. Além da eminente taxa de transferência de elétrons, possui uma forte

rigidez mecânica, alta condutividade térmica, grande flexibilidade e potente robustez (NAG; MITRA; MUKHOPADHYAY, 2018).

Em virtude das magníficas particularidades, o campo da eletroanálise é uma área amplamente considerada para aplicação sendo uma das principais escolhas para desenvolver sensores eletroquímicos (LAWAL, 2015). Nisso, demonstra uma grande janela de potencial e propriedades condutoras. Com suas características adsorptivas, vem sendo explorado como âncora através da formação de nanocompósitos sobre a superfície de eletrodos. Sua grande área superficial ajuda a maximizar o ancoramento de biomoléculas desejadas para a interação com o analito, resultando, assim, em um maior número uniforme de locais eletroquimicamente ativos (NAG; MITRA; MUKHOPADHYAY, 2018).

Figura 23 - Grafeno, na parte superior, e as estruturas relacionadas: fulereno (canto inferior esquerdo); nanotubos de carbono (centro inferior); e grafite (canto inferior direito).



Fonte: Geim e Novoselov (2007).

Para manipulação e obtenção de filmes nanoestruturados, geralmente faz-se necessário a dispersão do grafeno. No entanto, a forte interação de suas folhas implica numa pobre estabilidade coloidal na maioria dos solventes orgânicos. A dispersibilidade aquosa é geralmente pobre com agregação ocorrendo rapidamente. Já foram identificados diversos solventes para a dispersão do grafeno, em particular: N-metilpirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO) e N-dimetilformamida (DMF). Líquidos iônicos também podem entrar nesta lista por apresentarem resultados promissores. A dispersão é mais comumente obtida por sonicação, ao criar tensões de cisalhamento e cavitação. Ademais, a funcionalização química pode melhorar bastante a dispersibilidade, pois os grupos funcionais permitem que ele seja solubilizado em uma variedade de solventes orgânicos (JOHNSON; DOBSON; COLEMAN, 2015).

De acordo com as características físicas e químicas, podemos encontrar várias formas de grafeno, entre elas o Óxido de Grafeno (GO) e o Óxido de Grafeno Reduzido (RGO), que são atraentes para a montagem de superfícies sensoras (SADEGH, 2017). O GO é produzido pela oxidação do grafite tendo a presença de grupos funcionais polares com o átomo de oxigênio através de ligações sp^3 . Logo, é rico em ácidos carboxílicos em suas bordas, e grupos hidroxila e epóxi em planos basais, o que confere várias rotas de funcionalização e boa dispersão em água (ZHU et al., 2010). Isso faz do GO um excelente material para aplicações biológicas, já que seus grupos funcionais interagem com ácidos nucleicos, proteínas, células e outras moléculas orgânicas. No entanto, o GO não é um bom condutor elétrico devido ao rompimento de suas ligações sp^2 à medida que os grupos funcionais são introduzidos, o que pode restringir as aplicações nanobiotecnológicas. Para superar essas dificuldades, a forma reduzida do GO tem sido escolhida como alternativa (RODRIGUEZ et al., 2015). O RGO tem sido mais comumente usado para formar nanocompósitos com nanopartículas ou polímeros para aplicações biomédicas, como na liberação controlada de fármacos, modalidades terapêuticas para tratamento de câncer, substratos para efeitos antibacterianos, suporte para cultura de células de mamíferos e transferência de genes (CHUNG et al., 2013).

A funcionalização é um processo no qual, certas moléculas ou grupos funcionais são introduzidos por modificações tanto físicas quanto químicas. Métodos covalentes e não covalentes para a funcionalização do RGO foram estudados. A modificação não-covalente é um método que envolve condições suaves (sonicação, temperatura ambiente, etc.), não afetando a estrutura e, por esse motivo, é normalmente a mais aproveitada utilizando, por exemplo, a adsorção física, tanto de polímeros quanto de pequenas moléculas, via interações de van der Waals nos planos basais de suas folhas (DREYER et al., 2010).

2.2.6.2.2 *Nanotubos de carbono*

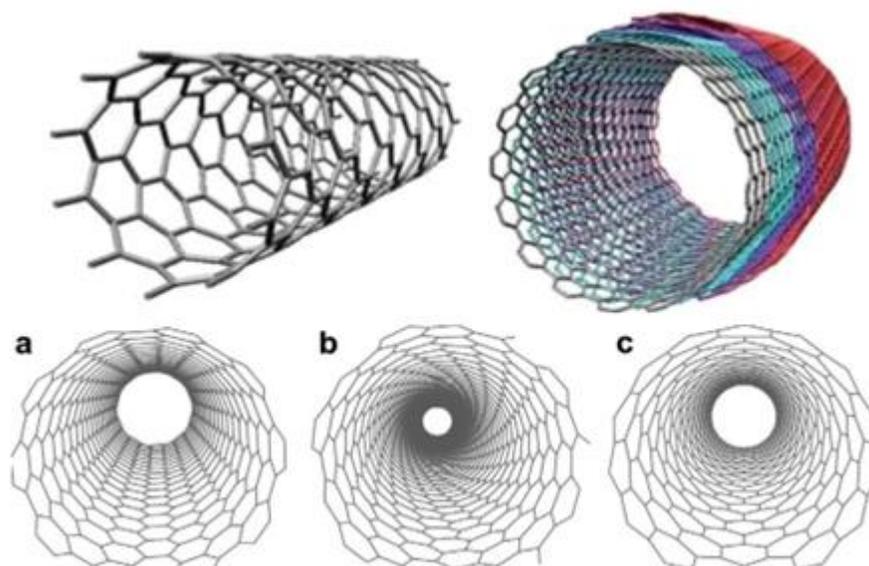
Outra saliente nanoestrutura são os nanotubos que permitem a interação com biomoléculas para aplicações em biossensores (GHASEMI et al., 2017). Descobertos em 1991 por Iijima, os nanotubos de carbono (CNT) podem ser descritos como arranjos hexagonais do carbono em formato cilíndrico, mantidos por interações de van der Waals nas camadas adjacentes. Promovem rápida transferência de elétrons, expandindo a taxa de reação de muitas espécies eletroativas e, diminuindo, conseqüentemente, o tempo de resposta do sensor, alcançando assim alta sensibilidade com baixos limites de detecção (TÎLMACIU; MORRIS, 2015).

Com relação à arquitetura, o CNT está classificado em uma monocamada ou em multicamadas concêntricas, abertas ou fechadas (MERUM; VELURU; SEERAM, 2017). Na Figura 24, as duas categorias são representadas como nanotubo de parede única (SWCNT), formado por uma única camada de átomos de carbono dispostos de forma hexagonal, e nanotubo de paredes múltiplas (MWCNT) que consiste de várias camadas de átomos de carbono dispostos de forma hexagonal em torno de uma área central (DASGUPTA et al., 2017). O comprimento e o diâmetro varia na ordem de nanômetros dependendo do tipo e método de síntese (AQEL et al., 2012). A arquitetura apropriada é refletida nas

propriedades altamente anisotrópicas. A maioria das extraordinárias características elétricas, térmicas e mecânicas é localizada especificamente ao longo da direção axial. A forte ligação sp^2 entre os átomos de carbono produz uma força mecânica notável, tornando-os um dos materiais mais resilientes (LI; PANDEY, 2015).

Os SWCNT são encontrados em três estruturas diferentes: poltrona, ziguezague e quirral (Figura 24). Apresenta propriedades metálicas e semicondutoras, onde tal atributo é determinado pelo arranjo atômico (quiralidade) e diâmetro do nanotubo (WILDER et al., 1998; YANG et al., 2015). Eles demonstram significativa estabilidade química, notável resistência mecânica e condutividade elétrica. Os MWCNTs mostram propriedades eletrônicas metálicas similares, que em alguns aspectos as tornam mais adequadas para aplicações eletroquímicas (HU et al., 2010). Ambos os tipos contêm estrutura unidimensional tubular única exibindo forte capacidade de adsorção, excelente bioconsistência e transferindo altas correntes com insignificante aquecimento (WEI; VAJTAI; AJAYAN, 2001).

Figura 24 - Classificação dos nanotubos de carbono (parte superior). Representação esquemática dos três tipos de nanotubo de parede única (parte inferior): (a) Poltrona, (b) Quiral e (c) Ziguezague.



Fonte: Gupta, Murthy e Prabha (2018).

A exploração bem-sucedida de suas potencialidades os tornaram nanomateriais preferenciais para aplicação em imunossensores. Eles conseguem conduzir eletricidade cerca de 100 vezes maior do que os fios de cobre, mediar a rápida cinética de transferência de elétrons para uma ampla gama de espécies eletroativas e transduzir eficientemente os sinais elétricos gerados durante a pesquisa de um bioanalito (HU; HU, 2009; WANG, 2005). Aliás, exibem propriedades ópticas singulares, como a fotoluminescência no infravermelho próximo (NIR) (WELSHER et al., 2008) e o espalhamento Raman forte ressonante (LIU et al., 2010).

Entretanto, estas aplicações têm sido prejudicadas por muito tempo devido à inconveniência da insolubilidade, uma vez que suas superfícies lisas são hidrofóbicas. Os CNTs apresentam um alto peso molecular e uma capacidade de emaranhar, isto é, a tendência de interagir individualmente entre si através das forças de van der Waals, agregando-se em feixes e cordas. No entanto, esses feixes podem

ser bastante grandes, tornando-se insolúveis em qualquer solvente; podendo ser difícil dispersá-los em meio aquoso ou não aquoso (GIRIFALCO; HODAK; LEE, 2000). Os CNTs funcionalizados são mais facilmente dispersados em líquidos, apresentando melhor biocompatibilidade e baixa toxicidade. A grande contribuição da química de conjugação é torná-los passíveis de modificação com proteínas, aptâmeros, ácidos nucleicos. Assim, do mesmo modo no grafeno, a funcionalização dos CNTs pode ser feita por abordagens tanto covalentes quanto não-covalentes. A funcionalização covalente é feita pela formação de ligações com as paredes laterais dos nanotubos, enquanto a funcionalização não covalente ocorre através da interação entre o domínio hidrofóbico de uma molécula anfifílica e a superfície do CNT (GUPTA; MURTHY; PRABHA, 2018).

A ultrasonicação é um método eficaz para dispersar os CNTs em líquidos de baixa viscosidade, como água, acetona e etanol. Porém, a maioria dos polímeros está tanto em um estado sólido ou estado líquido viscoso, requerendo que o polímero seja dissolvido ou diluído utilizando um solvente para reduzir a viscosidade antes da dispersão dos CNTs. As dispersões estáveis mais simples foram obtidas utilizando um solvente capaz de interagir eficazmente com CNTs, tais como álcool fenetílico, N-metilpirrolidona (NMP), N, N-dimetilformamida (DMF) e N, N-dietilacetamida (DEA). Uma estratégia adicional para favorecer a dispersão em solventes orgânicos é revestir os CNTs com uma molécula caracterizada por uma elevada afinidade pelas paredes laterais dos nanotubos e que seja ao mesmo tempo solúvel no solvente selecionado. Tanto moléculas pequenas como polímeros formados por unidades repetitivas de cadeias alquílicas e compostos aromáticos têm sido usados como dispersantes. A maioria dos polímeros e blocos de copolímeros tem sido utilizados para envolver o CNT expondo seus domínios polares em direção aos ambientes aquosos, enquanto propicia o contato de seus domínios hidrofóbicos com a superfície do nanotubo (DI CRESCENZO; ETTORRE; FONTANA, 2014).

Métodos para a imobilização em CNTs têm sido largamente exploradas com o objetivo de melhorar a sensibilidade em um imunossensor. A área superficial específica de CNT permite uma grande quantidade de biomoléculas ancoradas pela funcionalização não covalente e covalente para diferentes tipos de transdução. A ativação dos CNTs por tratamento de oxidação introduz grupos funcionais químicos, incluindo grupos funcionais oxigenados, carboxílicos, aldeídicos, cetônicos e esterícos oxigenados. A funcionalização não covalente permite a adsorção reversível de biomoléculas na superfície do CNT. Os CNTs são mecanicamente desmembrados e depois estabilizados por moléculas dispersantes através de interações não covalentes. Isso não causa mudanças nas estruturas químicas, propriedades eletrônicas e mecânicas dos nanotubos de carbono e, portanto, é um método bastante atraente (ZHU, 2017). Já a funcionalização química covalente decorre principalmente de moléculas orgânicas reagindo com grupos carboxílicos dos CNTs tratados por oxidação, o que irá depender da hidrofília / hidrofobia das espécies aderidas, o que pode tornar os nanotubos de carbono solúveis em água ou solventes orgânicos. A modificação de superfícies de CNTs por ligações covalentes com grupos solúveis geralmente altera características intrínsecas, tais como condutividade, resistência mecânica e propriedades ópticas (DI CRESCENZO; ETTORRE; FONTANA, 2014; TUNCEL, 2011).

2.2.6.3 Polímeros condutores

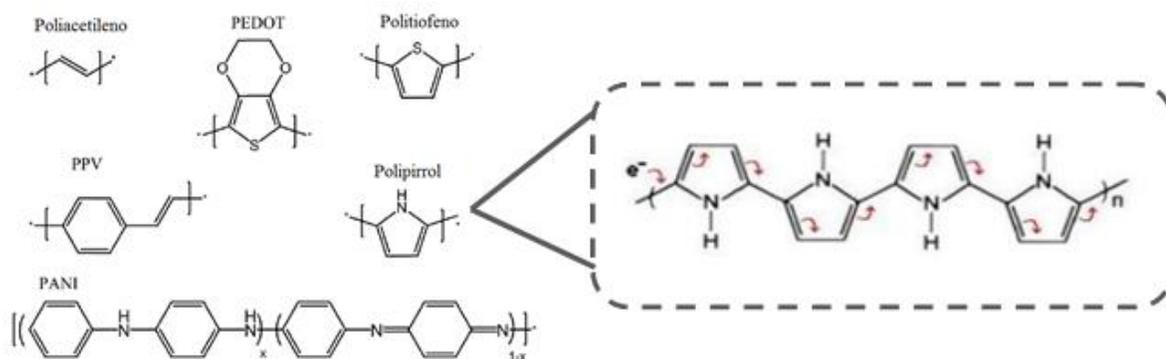
A condutividade (σ) é o inverso da resistividade (ρ) e, portanto, tem a unidade inverso do Ohm (Ω^{-1}), também conhecida como Siemens (S), por unidade de distância, geralmente centímetros, ou seja, (S/cm). Assim, a condutividade é uma medida de condução elétrica e, portanto, uma medida da capacidade de um material passar corrente. Geralmente, materiais com condutividade inferior a 10^{-8} S/cm são considerados isolantes, materiais com condutividade intermediária, entre 10^{-8} e 10^3 S/cm são considerados semicondutores, e materiais com condutividade superior a 10^3 S/cm são considerados condutores (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

Tendo isso em mente, uma das classes de agentes modificadores de destaque em biossensores são os polímeros condutores, uma vez que o seu uso é considerado um marco na ciência analítica moderna, sendo largamente procurados como complemento de reforço de sinal em aplicações eletroanalíticas. Eles são compostos orgânicos ou inorgânicos de alto peso molecular. Conceitualmente, essas macromoléculas são cadeias formadas pela múltipla repetição de simples unidades ligadas covalentemente entre si. Daí a origem grega do termo (poli “muitos”, meros “partes”), pois os monômeros são essas unidades básicas que irão constituir os polímeros por meio de reação química (CANDIAN, 2007). Antigamente eles eram conhecidos apenas por serem isolantes térmicos e elétricos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Os polímeros intrinsecamente condutores são, em geral, materiais de natureza orgânica, isto é, constituídos por átomos de carbono e hidrogênio, mas ainda sendo eletricamente condutivos, pois não ficam condicionados à adição de cargas condutoras (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007). Ao contrário dos outros polímeros orgânicos convencionais, eles possuem propriedades elétricas inerentes formidáveis como alta afinidade eletrônica e atividade redox (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016), além de propriedades ópticas e magnéticas similares aos materiais metálicos e aos semicondutores inorgânicos (MEDEIROS et al., 2012).

Desde a descoberta, tem havido uma abundância de pesquisas sobre suas aplicabilidades. Dentre os polímeros condutores de maior estudo em imunossensores podemos citar o poli(acetileno), poli(3,4-ethilenodioxítiofeno) (PEDOT), poli(tiofeno) (PTh), poli(p-fenileno vinileno) (PPV), poli(pirrol) (PPy) e poli(anilina) (PANI) (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016). Ao contemplar a estrutura molecular (Figura 25), percebe-se que eles são formados por uma cadeia principal contendo ligações de carbono simples e duplas alternadas (C–C=C), por isso, pertencem à classe dos polímeros conjugados (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). As insaturações conjugadas são críticas para a condutividade, pois resultam em elétrons desemparelhados e deslocalizados ao longo da cadeia hidrocarbônica o que lhe conferem a capacidade de gerar um fluxo eletrônico ordenado (MEDEIROS et al., 2012). Dentre as vantagens na modificação eletródica podemos destacar sua biointeração e biocompatibilidade, propensão proporcionada por sua natureza orgânica (KHAN et al., 2017). Sua utilização propicia a transferência de elétrons, a eletrocatalise, robustez e adição de grupamentos funcionais (WANG; ZHANG; ZHANG, 2010; SILVA et al., 2015). Além disso, eles tem atraído muito interesse como matriz para imobilização de biomoléculas livre de marcação, visto que podem servir como intermediários na interação entre o bioreceptor e o eletrodo,

além de auxiliar na transdução do sinal elétrico com o objetivo de melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção de biossensores eletroquímicos (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016).

Figura 25 - Lado esquerdo: representação da estrutura química dos principais polímeros condutores utilizados na fabricação de imunossensores. Lado direito: estrutura com ligações duplas alternadas do pirrol e caminho de condução eletrônica no polipirrol.



Fonte: Adaptado de Aydemir, Malmström e Travas-Sejdic (2016).

Tais polímeros demonstram facilidade de síntese com versatilidade na preparação e processamento, visto que, suas características podem ser prontamente moduladas pela ampla gama de moléculas que podem ser retidas ou usadas como dopantes químicos (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Deste modo, eles podem ser precisamente depositados em eletrodos aumentando sua área de superfície, e ser intimamente interligados com constituintes biológicos essenciais para um mecanismo de transdução mais efetivo (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). O desempenho em nanobiossensores varia de acordo com tamanho, forma, condutividade e morfologia (PARK; LEE; KWON, 2016). A síntese pode ser feita tanto quimicamente quanto eletroquimicamente, podendo formar cargas positivas ou negativas. A síntese química não só fornece muitas rotas diferentes possíveis para sintetizar uma variedade de polímeros, mas também permite o aumento de escala de produção, o que atualmente não é possível com a síntese eletroquímica. Este último é uma alternativa comum, particularmente porque este procedimento é relativamente simples (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007). A diferença mais significativa entre os métodos é que filmes poliméricos muito finos na ordem de 20 nm podem ser produzidos usando a técnica eletroquímica, enquanto filmes espessos ou pós são tipicamente produzidos por polimerização química (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

A preparação de síntese eletroquímica remonta a 1968, quando o "pirrol negro" foi formado como um precipitado em um eletrodo de platina, ao ser exposto numa solução aquosa de pirrol e ácido sulfúrico a um potencial oxidativo (OLIO et al., 1968). Hoje, a polimerização eletroquímica é realizada utilizando-se a configuração tri-eletródica imersa em solução do monômero, solvente apropriado e eletrólito (dopante). A corrente é passada através da solução e a eletrodeposição ocorre no eletrodo ou ânodo de trabalho carregado positivamente. Os monômeros na superfície do eletrodo de trabalho sofrem oxidação para formar cátions radicais que reagem com outros monômeros ou cátions radicais, formando cadeias poliméricas insolúveis na superfície do eletrodo. Diversas variáveis importantes

devem ser consideradas, incluindo tempo e temperatura de deposição, sistema do solvente (teor de água), eletrólito, sistema do eletrodo e carga de deposição. Cada um desses parâmetros tem um efeito sobre a morfologia do filme (espessura e topografia), mecânica e condutividade (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Maiores detalhes sobre os métodos de síntese serão vistos mais adiante.

Por serem amplamente aproveitados ao integrar os sinais produzidos pelos biocomponentes, informações semelhantes anteriormente descritas serão abordadas novamente. Dessa maneira, o aprisionamento eletroquímico, a ligação covalente, a adsorção física e afinidade são métodos normalmente usados para a incorporação de elementos de reconhecimento biológico sobre a matriz ou internamente em filmes de detecção (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016). Vale ressaltar que é particularmente crítico o caráter hidrofóbico de tais polímeros eletricamente condutores, pois é uma limitação importante para ancorar proteínas com êxito, protegendo sua conformação nativa (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Como eles podem carregar carga significativa, forças eletrostáticas entre os polímeros catiônicos e biomoléculas aniônicas, principalmente os oligonucleotídeos, desempenham um grande papel na adsorção física. No entanto, outras interações também estão envolvidas, especialmente na adsorção de anticorpos e antígenos. Essas interações biomoleculares incluem forças hidrofóbicas e forças de van der Waals. A principal vantagem da adsorção física é que ela simplesmente não requer nenhuma funcionalização dos monômeros. No entanto, devido às forças relativamente fracas, os biorreceptores podem ser desorvidos do eletrodo ao longo do tempo, afetando a estabilidade (AHUJA et al., 2007).

Para aumentar a eficiência da ligação e prolongar a imobilização, a técnica de aprisionamento físico é um método simples que integra imunocomponentes em filmes poliméricos durante a eletrodeposição (BARISCI et al., 1998). Este processo é usualmente realizado sob condições moderadas, isto é, sem reações químicas que poderiam alterar a atividade de proteínas, requerendo apenas um único passo para isso. O polipirrol é frequentemente considerado o polímero mais adequado para essa técnica, pois pode ser eletropolimerizado em soluções aquosas em pH neutro e com baixo potencial. No entanto, como os elementos de captura ficam, ao menos, parcialmente enterrados dentro do filme polimérico sem orientação específica, a acessibilidade do alvo pode não ser eficiente (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016; DOLATABADI; GUARDIA, 2014). Além do impedimento estérico, outras desvantagens desta técnica é que ela é apenas adequada para monômeros solúveis em água e a natureza hidrofóbica do polímero compromete a estrutura quaternária das proteínas, afetando o sítio ativo e diminuindo a bioatividade (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

Na modificação covalente comumente utiliza-se a formação de ligações via reação química do 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/NHS) para acoplar o grupo do ácido carboxílico ao grupo amina entre o polímero e o imunorreceptor no eletrodo (XIA et al., 2013). Em virtude dessa ligação ser realizada após a polimerização, é uma técnica versátil, não invasiva que pode ser ajustada de acordo com as propriedades dos peptídeos bioativos. Por isso, o procedimento de acoplamento é realizado sob condições aquosas suaves para não induzir à

desnaturação proteica, preservando, assim, a integridade biológica. A bioconjugação química por reticulação é uma abordagem tipicamente mais robusta e estável a fatores ambientais externos, o que aumenta a vida útil do biossensor. Entretanto, é geralmente mais complexa e desafiadora para polímeros insolúveis (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007; HERMANSON, 2013). A fixação por afinidade é outra abordagem alternativa explorada. Entre as diferentes afinidades, o complexo avidina-biotina tem recebido bastante interesse (TORRES-RODRIGUEZ et al., 1998).

2.2.6.3.1 *Nanocompósitos*

Os últimos anos têm testemunhado muitos estudos nas áreas de nanociência e nanotecnologia focando os esforços para o desenvolvimento de nanocompósitos. Eles são definidos como a combinação de dois ou mais materiais visando o aproveitamento das características de ambos (SANTANA, 2015). Ao menos um de seus componentes apresentam dimensões nanométricas. As interações na interface material tendem a serem melhoradas via nanoescala e isto faz com que haja um aperfeiçoamento das características desejadas (MORAES; BOTAN; LONA, 2014).

Eles podem ser classificados de acordo com a natureza de sua matriz, sendo chamados de nanocompósitos de matriz metálica, nanocompósitos de matriz cerâmica e nanocompósitos de matriz polimérica. Os nanocompósitos poliméricos são materiais de alto desempenho que exibem propriedade incomum de combinações e possibilidades únicas de design, sendo, por isso, considerados os materiais do século XXI. Como já mencionado, os polímeros são amplamente utilizados como dispersantes e modificadores não covalentes. As funcionalizações podem ocorrer com a síntese desses polímeros juntamente com outros nanomateriais (SHRIVASTAVA; JADON; JAIN, 2016). Dessa forma, são vastamente aproveitados na preparação de compósitos de CNT, grafeno, nanopartículas metálicas para detecção eletroquímica em virtude da nativa trans-mediação eletrônica, boa estabilidade ambiental, baixo custo e processos de dopagem (SHRIVASTAVA; JADON; JAIN, 2016; KUMAR et al., 2017). Além da condutividade elétrica de tais polímeros nanoestruturados, a combinação dos atributos poliméricos, como flexibilidade, baixa densidade e facilidade de modificação estrutural são suficientes para muitas aplicações comerciais de potencial tecnológico (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007). Também podem ser superoxidados para criar uma camada eletricamente isolante. Muitos relatos científicos demonstraram que CNTs revestidos com polímeros, incluindo polipirrol, poli (azul de metileno), poli (vermelho neutro), poli (ácido acrílico) e poli (3-metiltiofeno) tem se tornado uma estratégia bem conhecida (GAO et al., 2012).

2.2.6.3.2 *Polipirrol*

O pirrol é bem difundido na natureza, sendo o anel pirrólico encontrado em uma multiplicidade de produtos naturais e compostos farmacológicos. Foi isolado pela primeira vez em 1857 a partir dos produtos da pirólise óssea e identificado como biologicamente relevante depois de ter sido reconhecido como um fragmento estrutural do grupo heme (porfirina) e da clorofila (ESTÉVEZ; VILLACAMPA; MENÉNDEZ, 2010). Além do exemplo clássico do núcleo de tetrapirrol das porfirinas na hemoglobina,

há o caso da prodigiosina bacteriana de pigmento vermelho, sintetizada por enterobactérias do gênero *Serratia*, o qual possui propriedades antibióticas (WILLIAMSON et al., 2005). Ademais, existem também exemplos de metabólitos secundários derivados do pirrol que foram isolados de outras fontes bacterianas (ESTÉVEZ; VILLACAMPA; MENÉNDEZ, 2010).

O pirrol é um dos compostos heterocíclicos simples mais importantes na ciência dos materiais. Ele é higroscópico e incolor, mas torna-se escuro quando entra em contato com o ar. Sua história como polímero remonta 1916 quando foi sintetizado pela primeira vez através da oxidação química em água oxigenada (H_2O_2), originando um pó amorfo. Em 1968, foi sintetizado, eletroquimicamente, em solução de ácido sulfúrico, mas pouco tinha sido entendido nesta época e a descoberta foi perdida. Porém, somente em 1979, é que filmes crescidos eletroquimicamente receberam certa atenção (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007). Ele é um representante promissor dos polímeros condutores por causa de sua boa estabilidade química em condições ambientais, facilidade de síntese e alta condutividade. A aplicação multifuncional é vista em tecnologias de eletrodos para baterias recarregáveis, atuadores, supercapacitores, fabricação de fios em células fotovoltaicas e na área de biossensoriamento, principalmente, em vista da biocompatibilidade aliada a fácil deposição em pH fisiológico (WANG; LI; YANG, 2001; JAIN; JADON; PAWAIYAA, 2017).

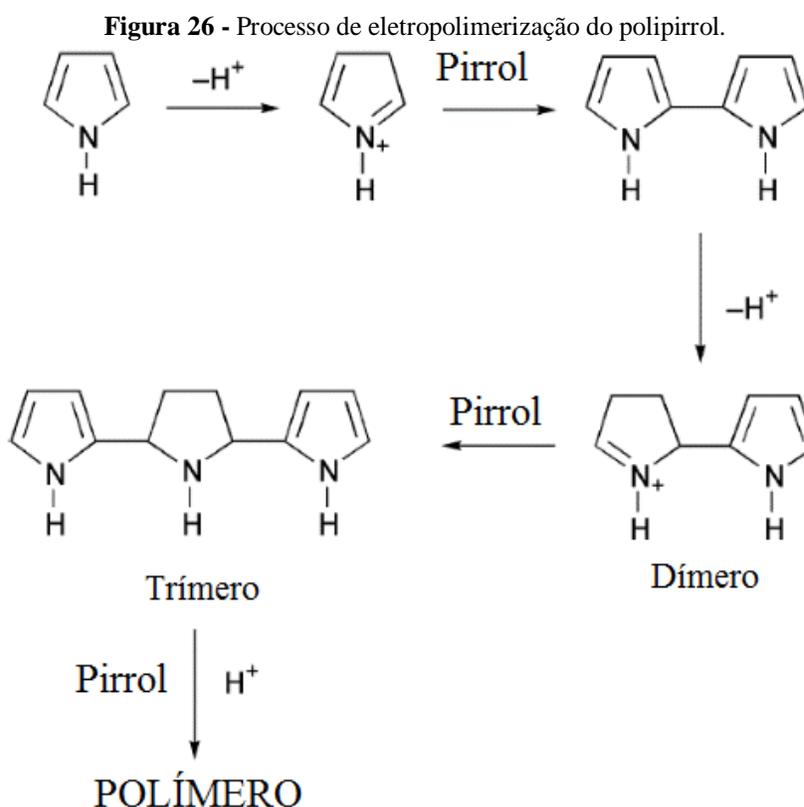
Por conta própria, o polipirrol (PPy, do inglês “*Pyrrrole*”) não é capaz de produzir uma condutividade apreciável. Para isso é necessário que haja a extração da carga parcial da matriz polimérica, obtida por um processo químico ou eletroquímico denominado dopagem. O processo de dopagem ocorre com a remoção (oxidação) ou inserção de elétrons (redução) do esqueleto conjugado. Reações de óxido-redução são efetuadas por agentes de transferência de carga (aceptores/doadores de elétrons). Esses agentes de troca iônica são chamados de contra-íons ou dopantes. Após sua adição em forma de solução eletrolítica, são incorporados durante o crescimento polimérico, balanceando a carga e convertendo o polímero de isolante em condutor. Como resultado, as cadeias poliméricas adquirem cargas positivas ou negativas, respectivamente (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007). Polímeros policonjugados adquirem alta condutividade com a adição de uma pequena concentração desses dopantes na matriz polimérica. Os materiais resultantes possuem condutividades típicas de metais ou semicondutores, variando de 1 a 10^5 S cm. A dopagem é um processo reversível. Ao se retirar o dopante, pode ser obtido o polímero inicial em sua estrutura intacta. A regulação do nível de dopagem fornece a possibilidade de preparar polímeros com condutividade elétrica amplamente variada, desde formas isolantes ou semicondutoras no estado não dopado até condições altamente condutivas no estado fortemente dopado (VERNITSKAYA; EFIMOV, 1997).

Dessa forma, características finais do polímero podem ser controladas convenientemente na superfície de eletrodos pela formação de monocamadas espontaneamente adsorvidas. A rota eletroquímica por cronoamperometria obtém filmes de boa qualidade em eletrodos com relativo controle, ao aplicar um potencial constante de aproximadamente 0,8V (MEDEIROS et al., 2012). O pirrol junto com um sal eletrólito são dissolvidos em um solvente adequado e então, a solução é submetida à oxidação, levando ao crescimento do filme condutor sobre o eletrodo de trabalho anódico imerso na

solução eletrolítica. Com o desligamento da corrente, o curso da eletrossíntese é imediatamente seguido pela interrupção do crescimento da cadeia. O filme não irá se formar em solventes apróticos nucleofílicos como DMF, DMSO, hexametilfosforamida (HMFA), a menos que a nucleofilicidade do solvente seja reduzida pela adição de um ácido prótico (VERNITSKAYA; EFIMOV, 1997).

O mecanismo de eletropolimerização atualmente aceito envolve o acoplamento de espécies oxidadas (Figura 26). Inicialmente ocorre a oxidação do monômero de pirrol e a geração de um cátion, sucedido pela dimerização do monômero com o acoplamento de dois radicais cátions. O dímero que foi formado por ser facilmente oxidado é, então, re-oxidado e une-se ao trímero. Todo o processo é finalizado quando: a reatividade do radical cátion diminui; ou quando ocorre a esterificação do final da estrutura em cadeia (KUMAR; SINGH; YADAV, 2015). A polimerização eletroquímica é, de fato, uma técnica rápida, fácil e limpa para preparação de filmes de PPy altamente condutores, mas existem fatores que podem influenciar as propriedades, particularmente na morfologia e espessura, por exemplo: tipo de substrato, número de ciclos no eletrodo e mobilidade dos contra-íons. (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007, MEDEIROS et al., 2012). A insolubilidade em solventes industriais comuns impedem de expandir o sistema de reação além da escala laboratorial (BROOKE et al., 2017). Ademais, diversos pesquisadores relatam que apesar de muitos anos de estudo, o mecanismo de eletropolimerização ainda não é totalmente elucidado, levando ao enfoque dos efeitos de alguns parâmetros na reação como: densidade de corrente, solvente, eletrólito e concentração do monômero (SABOURAUD et al., 2000).

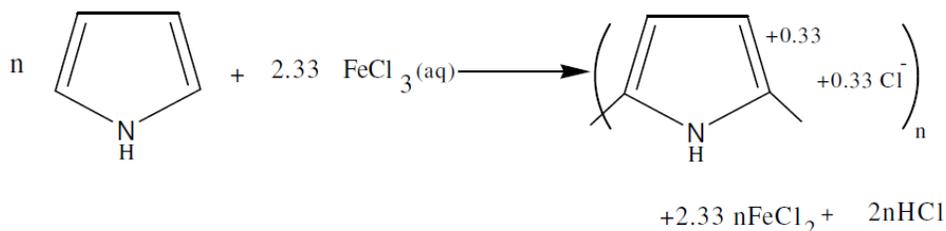
Assim, a síntese química tenta superar este obstáculo de fabricação, ao fornecer uma rota favorável para a produção econômica de filmes uniformes e finos de pirrol, e de seus nanocompósitos. Neste caso, o número de variáveis experimentais é bastante reduzido. Posto que este processo não necessita de instrumentação especial: potenciostato acoplado a célula eletroquímica, não há dependência de energia externa. Além disso, não se restringe apenas a substratos condutores, é possível utilizar o recurso da deposição química para recobrir diretamente outros materiais. A polimerização química é, portanto, de grande interesse industrial por conta do processamento, apresentando viabilidade muito maior para controlar o peso molecular e as características estruturais de polímeros conjugados. Por essas razões é mais fácil de ser realizada em grandes escalas, resultando na formação de pós ou dispersões coloidais (SKOTHEIM; REYNOLDS, 2007; BROOKE et al., 2017).



Fonte: Adaptado de Sabouraud (2000).

Várias técnicas de síntese química estão disponíveis merecendo destaque a polimerização oxidativa e a polimerização em fase vapor (VPP, do inglês, “*Vapour Phase Polymerisation*”). No método convencional de oxidação química, o composto oxidante desprotona o pirrol, iniciando polimerização por crescimento em etapas. Procedimentos bem sucedidos combinam oxidantes e monômeros juntos em solução. Embora seja bem simples de implementar, na prática apresenta limitações, levando a precipitação de grandes quantidades de polímero em pó, muitas vezes, mal condutor (ANSARI, 2006; BHATTACHARYYA et al., 2012; BROOKE et al., 2017). Para esta síntese química, o cloreto férrico ($FeCl_3$) e a água são os melhores oxidantes e solventes. Durante a polimerização em solução obtêm-se os íons Cl^- que são incorporados como contra-íons (ANSARI, 2006) (Figura 27).

Figura 27 - Polimerização química do pirrol utilizando o cloreto férrico como agente oxidante.

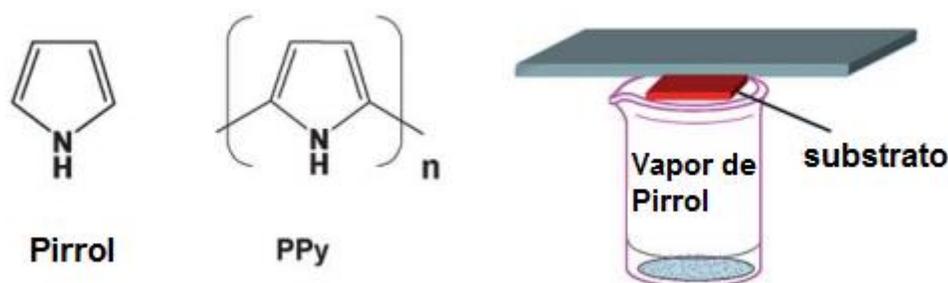


Fonte: Ansari (2006).

Na técnica VPP, o precursor monomérico e o agente oxidante não precisam estar dissolvidos em solvente (Figura 28). Para isso, três etapas são requeridas. O primeiro passo é a aplicação úmida de um agente oxidante ao substrato. O segundo passo é a exposição do substrato pré-tratado aos vapores do pirrol dentro de uma câmara fechada em condição ambiente ou sob vácuo de baixa pressão controlada na

presença de um gás inerte (Ar ou N₂), o que resulta na síntese do filme polimérico. O último passo é a lavagem da película depositada para remover oxidante em demasia e outros subprodutos. A volatilidade e a pressão de vapor do pirrol são propriedades de difusão marcantes para a síntese bem sucedida. Com isso, o problema da solubilidade e compatibilidade com solventes é solucionado (BHATTACHARYYA et al., 2012).

Figura 28 - Estrutura química do monômero e do polímero polipirrol. Esquema de uma câmara de polimerização em fase à vapor.



Fonte: Adaptado de Xia, Chen e Yanagida (2011).

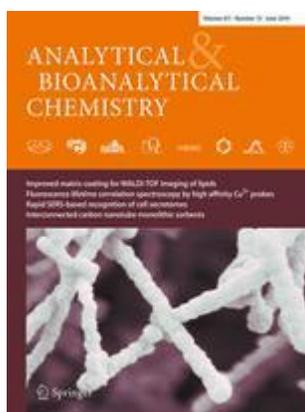
Os mesmos agentes de oxidação fortes tem sido implementados com resultados interessantes. O cloreto férrico (FeCl₃) aquoso ou anidro, e outros sais de ferro e cobre tem sido amplamente utilizados como oxidantes químicos. O uso de halogênios e receptores de elétrons orgânicos para a síntese do PPy também tem sido relatado. Cátions de ferro são normalmente usados e emparelhados com ânions cloreto, tosilato e uma variedade de sulfonatos para a dopagem. Contudo, é desejável que haja um excesso do oxidante para assegurar a sua disponibilidade contínua aos monômeros presentes, uma vez iniciada a polimerização (BROOKE et al., 2017). O composto oxidante desempenha o papel de um molde, levando à formação de polímeros morfologicamente ordenados e, às vezes, cristalinos com condutividade significativa.

A técnica VPP é uma rota sintética de grande rendimento, simplicidade e controlabilidade, sendo uma alternativa versátil de polimerização aplicada aos biossensores (BHATTACHARYYA et al., 2012). Para o desenvolvimento da pesquisa da tese, o cloreto ferroso (FeCl₂) e o pirrol foram utilizados para entrarem em contato pela interface líquido/vapor. O polipirrol foi sintetizado diretamente sobre o eletrodo de carbono vítreo devido à entrega dos precursores monoméricos dentro de uma câmara hermética. Os monômeros de pirrol foram condensados na superfície eletródica e a polimerização foi iniciada após desprotonação. Os ânions cloreto (Cl⁻) foram incorporados como contra-íons durante a dopagem, sendo essenciais para estabilizar os estados de polaron e bipolaron ao longo da cadeia policonjugada, já que no estado neutro, o polipirrol não é condutivo e somente se torna condutor quando oxidado. Ao contrário do FeCl₃, o FeCl₂ apresenta uma taxa mais lenta de polimerização o que permite a geração de cadeias poliméricas com longos comprimentos de conjugação. Com isso, o transporte de elétrons deslocalizados pode ocorrer com menos retardamento devido a defeitos estruturais ou químicos (BROOKE et al., 2017), além de proporcionar maior área de ancoragem de biomoléculas para acoplamento de unidades receptoras. Dessa maneira, um nanofilme de

CNT-COOH e polipirrol foi formado, sendo observável a olho nú como uma crosta preta e forneceu uma estável plataforma de imobilização de antígenos HBcAg.

3 RESULTADOS

Manuscrito a ser publicado na revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*



POLYMERIZATION FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS

^aDiego G. A. Cabral; ^aCybele E. Silva; ^aErika K. G. Trindade; ^aCecília M. Padro; ^aPaula A. B. Ferreira;

^aBárbara V. M. Silva; ^aBlanca A. G. Rodriguez; ^aRosa F. Dutra

^aBiomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

**Corresponding Author:*

Rosa Fireman Dutra

E-mail: rosa.dutra@ufpe.br

Abstract

An electrochemical immunosensor developed for detection to immunoglobulins against hepatitis B core antigens (anti-HBc) is reported. Anti-HBc is the first antibody produced by the hepatitis B virus (HBV) infection, remaining from the acute and chronic stages, and continuing throughout life. The immunosensing platform was assembled on nanocomposite film of carbon nanotubes (CNTs) and polypyrrole (PPy) on the glassy carbon electrode. Here it is explored the promising application of vapour phase polymerisation (VPP) method in order to maximize mass production above laboratory scale. All stages of electrode surface modification were characterized electrochemically by cyclic voltammetry. Microscopy Force Atomic was used to topographic characterization of the nanocomposite film. The electrode response was measured by direct interactions of anti-HBc by differential pulse voltammetry, dispensing use of label or chemical mediators. Under optimal conditions, the anodic peak current was proportional to the anti-HBc concentration, exhibiting a linear range between 1.25 to 7.5 ng.mL⁻¹, with a good correlation coefficient ($r= 0.977$) and a detection limit of 0.77 ng.mL⁻¹. The linear range achieved was according to clinical level, indicating the immunoelectrode as analytical tool for hepatitis B diagnostic, being ideally suitable for consolidation in blood banks or in epidemiological campaigns for the global combat against HBV. The nanocomposites of CNTs and PPy promoted a formidable increase of charge electron transfer, besides to providing a stable platform for immobilization of HBcAg antigens.

Keywords: Hepatitis B; immunosensor; carbon nanotubes; pyrrole; vapour phase polymerisation.

1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major public health problem worldwide. Although 257 million people know they have hepatitis B, most carriers are not previously aware of their clinical situation, preventing an early treatment, which it have resulted in 887,000 deaths due to the complications of the disease [1]. Infected people may progress clinically to three outcomes: acute hepatitis, fulminant hepatitis and chronic hepatitis [2]. The control of HBV infection is a challenging task, mainly in developing countries where there is limited access to diagnostics and antiviral treatment due to insufficient healthcare infrastructure [3,4]. For this reason, it has been used in the screening of blood bags around the world to reduce the risk of post-transfusion transmission [5,6].

Antibody against the hepatitis B virus core (anti-HBc) is one of the serological markers that soon appear on the infectious course and it persists practically throughout life, may be the only detectable in the case of occult hepatitis B. The methods currently used to execute the immunological diagnosis of hepatitis B are enzyme immunoassays (EIA), chemiluminescent immunoassays (CMIA), electrochemiluminescent immunoassay (ECIA) and immunochromatographic assays (ICA). However, for these conventional tests, minimizing the cost of whole detection process is still a challenging step since require automated, modern and sophisticated instruments, graduated professionals and proper laboratory organization. It restricts any large-scale application that may be used as inexpensive detection methodologies for point-of-care testing (POCT) [7]. Comparing with conventional immunoassays, electrochemical immunosensors have been shown great attention in the last years as interesting analytical tools for POCT due to their simplicity of handling, sensibility, low cost and ease interpretation, releasing quickly the results [3,8,9].

The advent of nanomaterials in immunosensor provides a great opportunity to increase of the analytical sensibility for HBV immunosensing. [3]. Carbon nanotubes (CNTs) have revolutionized the electrochemical immunosensor field due to their excellent electronic transfer kinetics, large potential window and greater surface area for anchoring of biomolecules with favorable orientation [10,11,12]. Although the CNTs exhibit attractive properties, their isolated use has been limited due to several problems, including the possibility to be leached during the measurements and exhibit low reproducibility. In these sense, the association of the CNTs with conductive polymers [13] provides more

robust and reproducible sensors. Among them conductive polymer, polypyrrole (PPy) have received great attention in electrochemical sensor due to ease synthesis and the great versatility to improve electrical proprieties in CNTs nanocomposites [14].

Some of the most exciting recent advances in nanocomposite synthesis have centered on the method of vapour phase polymerization (VPP), due to their simple procedure providing large-scale polymerization of the thin films on different substrates. In this process, a conductive film is generated by exposing a solid support coated with chemical oxidants to the vaporization of the monomer inside a deposition chamber, covering all substrate by the polymeric matrix. The VPP solves the problem of insolubility / incompatibility with solvents, does not depend on external energy and does not require special instrumentation, such as a potentiostat coupled to electrochemical cell [15,16]. Herein, a nanocomposite film based on CNT and PPy obtained basically by two-steps of synthesis was proposed for label-free electrochemical detection of anti-HBc, an important biomarker of the HBV infections.

2 Material and methods

2.1 Reagents

Mouse monoclonal antibodies against hepatitis B core (anti-HBc) and recombinant HBc antigens were purchased from Abcam (Cambridge, England) and were properly aliquoted according to the manufacturer's instructions. Potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$), glycine, N-hydroxysuccinimide (NHS), N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), ferrous chloride ($FeCl_2$) and pyrrole monomers (Py) (98%) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic groups (COOH-CNTs), 95% pure, were obtained from DropSens (Oviedo, Spain). Phosphate-buffered saline (PBS) (10 mmol L^{-1} , pH 7.4) was used in all experiments for dilution of biological samples. It was prepared by dissolving 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.24 g KH_2PO_4 , and 1.44 g Na_2HPO_4 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 a potentiostat from Ivium Technologies

(Eindhoven, Netherlands) that was interfaced to a computer system and controlled by *Ivium Soft* software for potential controlling, acquisition and data processing. All electrochemical measurements were carried out by using a conventional three-electrode system, comprising of a glass carbon electrode (GCE) as working electrode, Ag/AgCl_(KCl sat.) electrode as reference electrode and helical platinum wire as counter electrode. The data for the construction of the graphs and the analytical curves were processed by the *Origin LabTM* software, version 8.0.

Atomic force microscopy (AFM) was performed to characterize topography of the CNTs-FeCl₂/PPy film in a Nanosurf Flex AFM (Liestal, Switzerland) equipped with a C3000 controller by using TAP190AI-G tip in the noncontact mode. All mappings were performed in air at room temperature. The images obtained were treated and analyzed through software Gwydion (version 2.49).

2.3 Preparation of the CNTs-FeCl₂/PPy film

Prior to the use, GCE was polished with a velvet micro-cloth soaked in alumina with 0.3 μm granulometry for 3 minutes in order to obtain a clean mirror-like surface. Then, GCE was submitted to an ultrasound bath for 1 minute in ethanol to remove the residual alumina particles and other contaminants. Subsequently, an aliquot (3μL) of a solution of COOH-CNTs and FeCl₂ was pipetted on the cleaned GCE. This solution consisted of 1 mg.mL⁻¹ COOH-CNTs dispersed in ethanol, homogenized in an ultrasonic bath for 2 hours and, afterward, mixed to 1 mg.mL⁻¹ of FeCl₂ solution at 3 mol L⁻¹. After deposition, the GCE was submitted to drying at ambient temperature. The GCE modified with CNTs-FeCl₂ was maintained in contact with a vapour of the 100 μl of Py in a microtube for 30 min. The monomers were polymerized on the electrode surface and then, it was washed (**Figure 1a**). For comparative purposes, a traditional electropolymerization was performed by chronoamperometry. The nanocomposite film was achieved applying a working potential of 0.8 V (vs. Ag/AgCl_(KCl sat.)) immersing the electrode in a mixture containing 0.3 mol L⁻¹ Py in 0.35 mol L⁻¹ H₂SO₄ and 1 mg.mL⁻¹ COOH-CNTs previously dispersed in DMF [17].

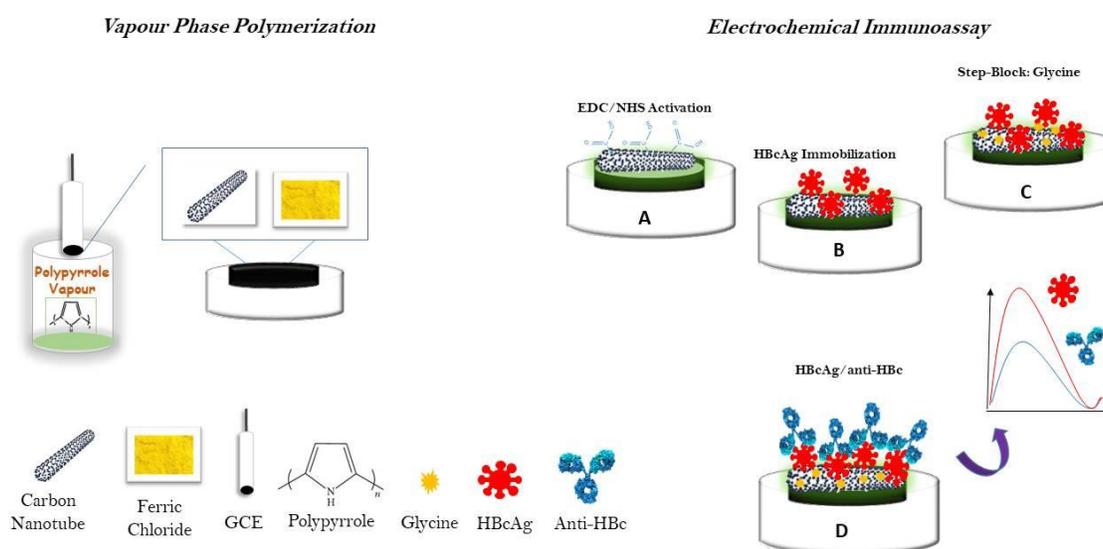
2.4 HBcAg Immobilization and immunoassay

Prior to covalent immobilization of the HBc antigens, the carboxylic groups of the CNTs-FeCl₂/PPy

film were activated with EDC/NHS solution (0.02 mol L^{-1} and 0.050 mol L^{-1} , respectively) during 1 hour. Afterwards, an aliquot of $3 \mu\text{L}$ of the HBcAg solution ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) was dropped onto the electrode surface and incubated for 1 h at room temperature. Nonspecific bindings were blocked by incubating the GCE surface in a solution of $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ glycine, prepared in citrate buffer for 30 min (**Figure 1b**). The steps of immunosensor preparation were characterized by cyclic voltammetry technique (CVs), and recorded at a window potential of -0.2 and 0.6 V and at 50 mV s^{-1} , using a solution of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0.005 mol L^{-1}) as redox probe.

The electrode was then submitted to successive incubations with anti-HBc (1.25 ng mL^{-1}) during 30 min. Among the antibody incubation steps, the GCEs were carefully washed with PBS buffer (0.01 mol L^{-1} , pH 7.4) to remove excess unbound. Antigen-antibody recognition was monitored directly at the sensor interface using the differential pulse voltammetry (DPV) technique at window potential of -0.2 to 0.6 V , with pulse amplitude of 0.12 , modulation time of $0,05$ and interval time of 0.5 , and 0.005 V step potential. All measures electrochemical were performed in $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0.005 mol L^{-1}) prepared in KCl (0.1 mol L^{-1}). The current values of the calibration curve were obtained from different concentrations of anti-HBc.

Figure 29 - Schematic illustration of the stepwise preparation of the immunosensor: (a) $\text{COOH-CNTs-FeCl}_2/\text{PPy}$ film formation via VPP and (b), the principle of the electrochemical immunoassay with the successive electrodic modifications.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3 Results and discussion

3.1 Formation and characterization of the $\text{CNT-FeCl}_2/\text{PPy}$ nanocomposite film

The immunosensor was based on vapor phase polymerization (VPP). The VPP is a synthetic route of nanostructured polymer films that has received interest in recent years for economical production of uniform and homogeneous films. It is a technique of great yield, simplicity and controllability [15]. The

electrode surface was covered by mixture containing FeCl_2 and then exposed to Py atmosphere inside an improvised hermetic chamber. Iron and copper salts composed of chloride, tosylate and sulfonate anions have been widely used as chemical oxidants for the polymerization of PPy films [16]. Then, FeCl_2 in the present study functioned as an oxidizing agent. This compound plays the role of a template, leading to the formation of morphologically ordered and sometimes crystalline polymers on pretreated solid supports in order to give a significant conductivity [18].

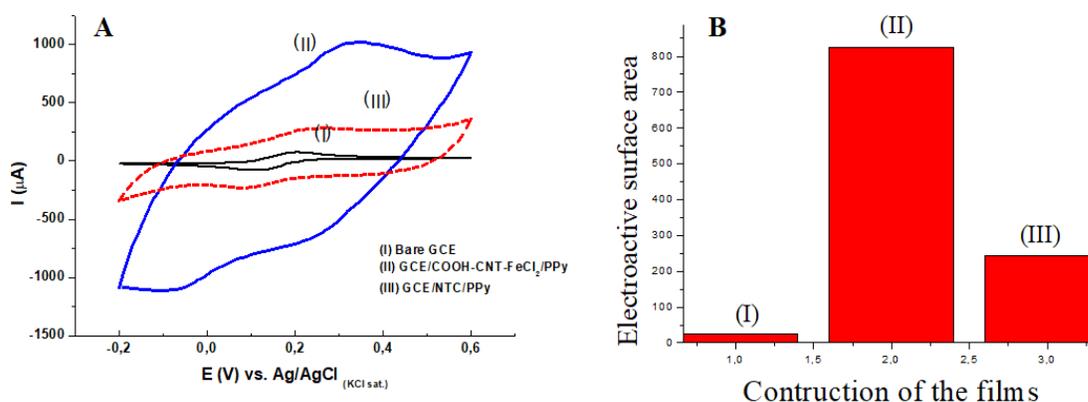
PPy was synthesized directly on the glassy carbon electrode due to delivery of the monomeric precursors through the vapor phase. The volatility and vapor pressure of the Py are outstanding diffusion properties for successful synthesis. The monomers are condensed at the electrode interface and polymerization is initiated after deprotonation. Chloride anions (Cl^-) are incorporated as counterions during process doping and are essential for stabilizing the polaron and bipolaron states along the polyconjugate chain [19], since in the neutral state, PPy is not conductive and only becomes conductive when it is oxidized [20]. Reduction-oxidation processes in the PPy conducting polymers involve mass and resistance changes, as well as electron transitions. Hence, polymeric film implies on increase of charge storage, with direct impacts on the capacitance. Here, specific capacitance (C_s) of PPy film was calculated based on electroactive area of the CV, according to equation: $C_s = \frac{\int i \cdot dV}{v \cdot m \cdot V}$; where i is the current, V appears for the potential window, v represents the scan rate and m is the mass of active material. C_s is the mass-specific capacitance (F/g). According to the cyclic voltammograms, the C_s value was found at xx F/g. It is theorized that the CNT increase the capacity to store charge resulting in both an increase in pseudo-capacitance and specific capacitance. It was observed an increase in the double-current (I_{dl}) of xx% higher in the nanofilm.

Unlike ferric chloride (FeCl_3), FeCl_2 has a slower rate of polymerization which allows the generation of polymer chains with long conjugation lengths. Thus, the delocalized electron transport can occur with less retardation due to structural or chemical defects [16], as well as to provide a larger anchorage area of biomolecules for coupling receptor units. This chemical deposition process is a simple way to prepare nanocomposites on special substrates, including non-conductive substrates. Thereby, a conductive nanofilm of CNT-COOH and PPy was formed, providing a stable platform for the immobilization of Hepatitis B core antigens (HBcAg). Generally, nanocomposite materials with CNT can show different

properties than those found of each individual component. The multifunctional behavior for any property of the nanocomposite is often more than the sum of the individual elements [20]. The large area and aspect ratios (length/diameter) of multiwall CNTs have made them efficient as conductive fillers in polymers [21]. Incorporation of the CNT to PPy film has yielded electrodes with great electrochemical performance, and also allowed composites with higher conductivity and increase of charge storage.

As one of the most common electrochemical detection methods, cyclic voltammetry (CV) could be not only used for the surface characterizations of the electrodes and detection, but also used as excellent electrode modification methods of the CNT-FeCl₂/PPy film, a comparative investigation was carried out by using two polymerization techniques: electrochemical and VPP. The film resulting of polymeric growth on the GCE was electrochemically characterized by CV measurements in K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (0.005 mol L⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L⁻¹). With the synergism between CNT and PPy, the voltammograms in Figure 2a show a considerable elevation of the current peaks value (I_{pa} and I_{pc}) of the electrode polymerized both by VPP and electrodeposition method. The increase in the electroactive area of the nanocomposite film obtained by VPP process was higher when contrasted in relation to polymerization electrochemical (Figure 2b). A significant improvement in electron transfer was realized in the biosensor platform demonstrating a 340% increase. The electrochemical results show that the conductivity properties of PPy integrated in a nanocomposite film is dependent of the polymerization method employed. In this reaction, it is believed that the cationic charge of the oxidized Py is balanced by the interaction with the carboxyl groups of the nanotubes [22].

Figure 30 - (A) Voltammetric profile of the GCE comparing the polymerization method of obtain of the COOH–CNT/PPy nanocomposite film: (I) bare electrode, (II) VPP method and (III) electrochemical method. Measures performed in K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (0.005 mol L⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L⁻¹), at 50 mV s⁻¹ scan rate. (B) The increase in the electroactive area of the nanofilms.

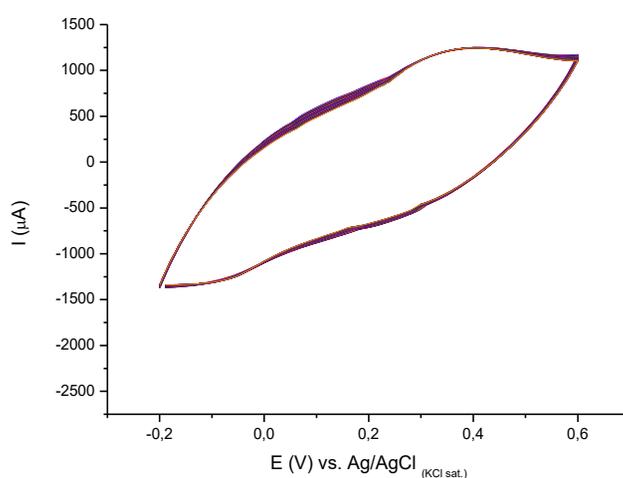


Fonte: Elaborado pelo autor.

The stability of the COOH–CNTs/PPy film obtained by vapour phase polymerization was performed

by submitting the electrode to 20 successive voltammetric cycles (Figure S1-Supplementary data). The relative standard deviation (RSD) resulting from the anode and cathode peaks of the scans were calculated to analyze the stability of the CNT-FeCl₂/PPy film and the values found respectively were 1.89% and 2.21%, respectively to I_{pa} and I_{pc}, showing in accordance with limit values adopted in biomedical equipment (RSD ≤ 5%).

Figure 31 - Stability of the COOH-CNT/PPy film when submitted to 20 successive voltammetric cycles. Measures performed in K³[Fe(CN)₆]/K⁴[Fe(CN)₆] (0.005 mol L⁻¹) prepared in KCl (0.1 mol L⁻¹) at scan rate of 50 mV s⁻¹.

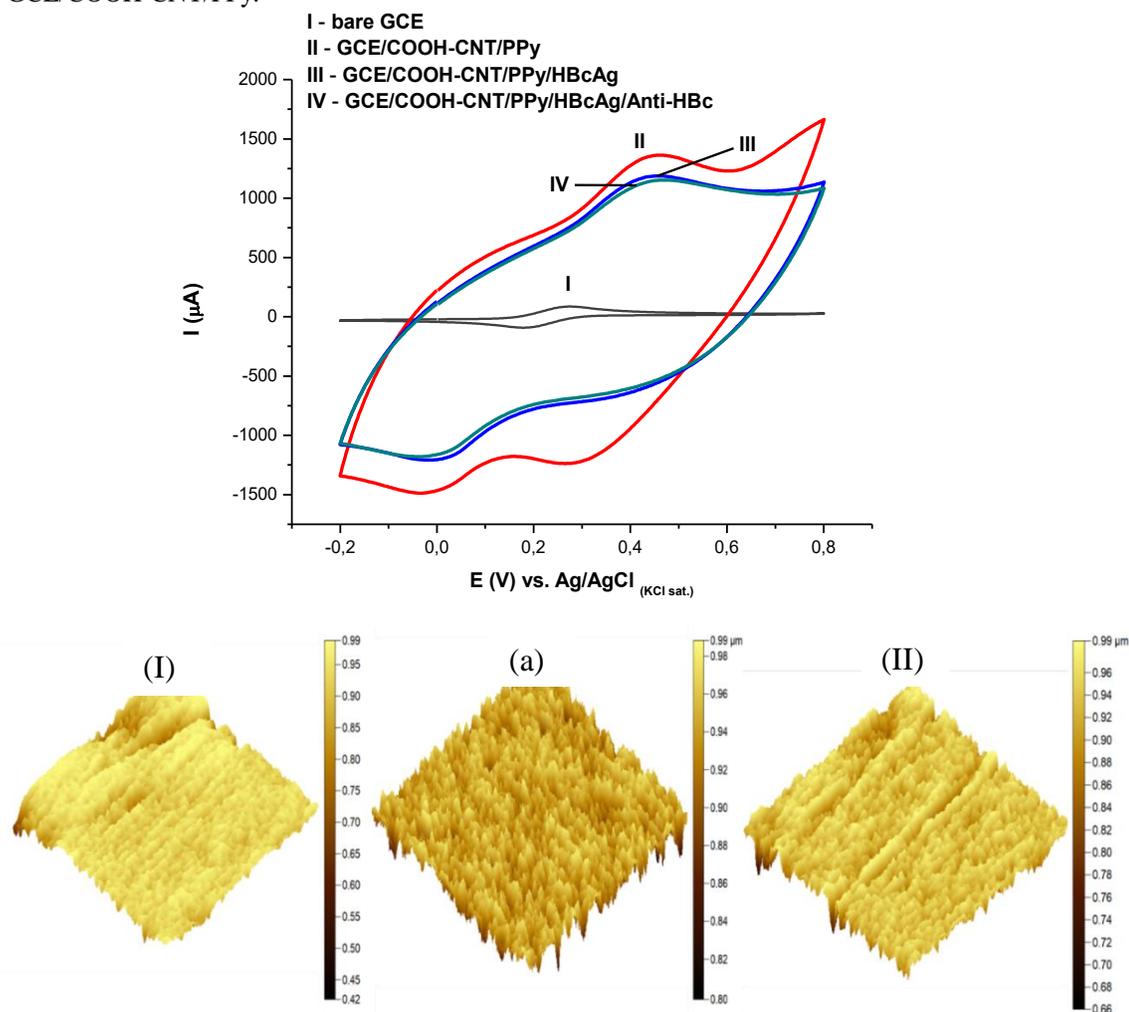


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Topographic and electrochemical characterization of the nanocomposite film and assembling of the immunosensor

AFM was used in order to characterize the COOH-CNTs-FeCl₂ layer and COOH-CNTs-FeCl₂/PPy film on GCE modified in comparison with that of bare electrode as shown in Figure 3. AFM imaging of nanocomposite onto glassy carbon discs helped to gain understanding of the topography and roughness of the films. The mean of Roughness Maximum Heights (Rt) obtained were: 67.2 nm for bare electrode (I), 70.1 nm for only nanomaterial of CNT (a) and 95.7 nm after covering with polymer PPy (II). The AFM images demonstrated that CNT-COOH and PPy nanocomposites were successfully synthesized by VPP method. It could also be observed by the surface topographic scanning that there was an increasing pattern of surface irregularity as the platform was being completely assembled. It can be seen clearly that the porosity per unit area is denser in the case of nanofilm, evidently because the increase of the surface roughness is due to the aggregation of CNTs within PPy.

Figure 32 - Above: CVs of the stepwise of the assembly procedure of the immunosensor: (I) bare GCE, (II) GCE/COOH-CNT/PPy; (III) GCE/COOH-CNT/PPy/HBcAg and (IV) GCE/COOH-CNT/PPy/HBcAg/Glycine. Voltammograms were obtained in an $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ solution (0.005 mol L^{-1}) prepared in KCl (0.1 mol L^{-1}). Below: AFM micrographs comparing different steps of assembling of the nanocomposite film: (I) bare GCE; (a) GCE/COOH-CNT-FeCl₂; (II) GCE/COOH-CNT/PPy.



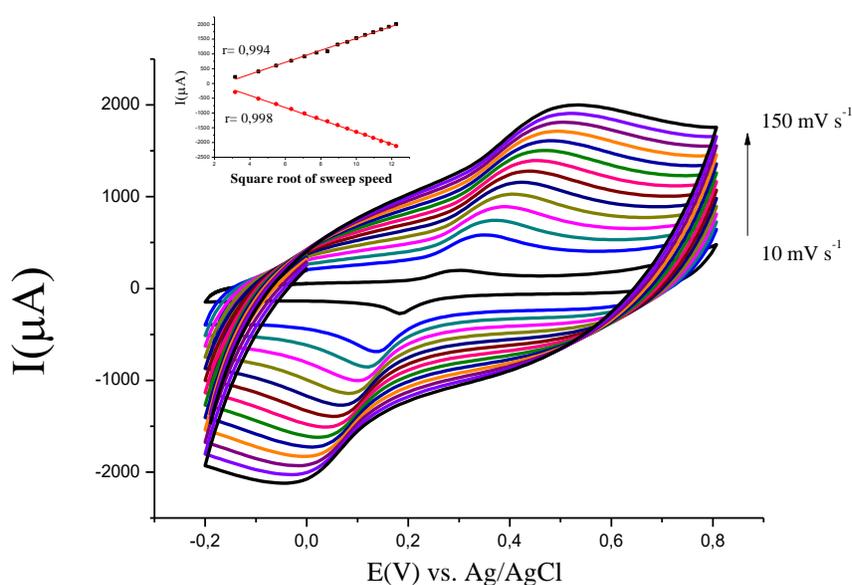
Fonte: Elaborado pelo autor.

The electrochemical characterization of the stepwise of the immunosensor was performed by using CV, as can see in Figure 3. When compared the voltammograms of the bare GCE (curve I) and after the assembling of the GCE/COOH-CNT/PPy (curve II), it was observed a strong increase of the redox peaks and the electroactive area. A reduction in current values was observed after immobilization of HBcAg due to the insulating nature of biological molecules (curve III). After the blocking step, a slight reduced of the current was exhibited (curve IV). The glycine utilized with blocking agent could react with unreacted carboxylic groups of the nanocomposite film on the sensor surface.

The electrochemical mechanism involved in the electronic transfer of the nanocomposite film can be studied by the relation between the peaks of current and the scan rate. In this study, GCE/COOH-CNT/PPy was immersed in an electrochemical cell with $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) solution and then submitted to CVs measurements at different scan rates (10 to 110 mV s^{-1}). A proportional increase in the amplitudes of peaks currents in relation to scan rates was observed (Figure 4). The

electrochemical behavior of the nanostructured film was evaluated through the relation of the I_{pa} and I_{pc} versus the square root of the scan rate ($v^{1/2}$). The I_{pa} and I_{pc} raised linearly with the increase of the $v^{1/2}$, indicating an electron transfer controlled by diffusion (Figure 4, insert). The coefficient of variation was $r = 0.994$ and $r = 0.998$ for cathodic and anodic peaks, respectively, with $p \leq 0.05$ confirming the linearity of the curve.

Figure 33 - CVs of the GCE/COOH-CNT/PPy under different scan rates (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 mV s^{-1}). Measures performed in $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) prepared in KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); (Insert) Graph of the I_{pa} and I_{pc} versus square root of the scan rates.



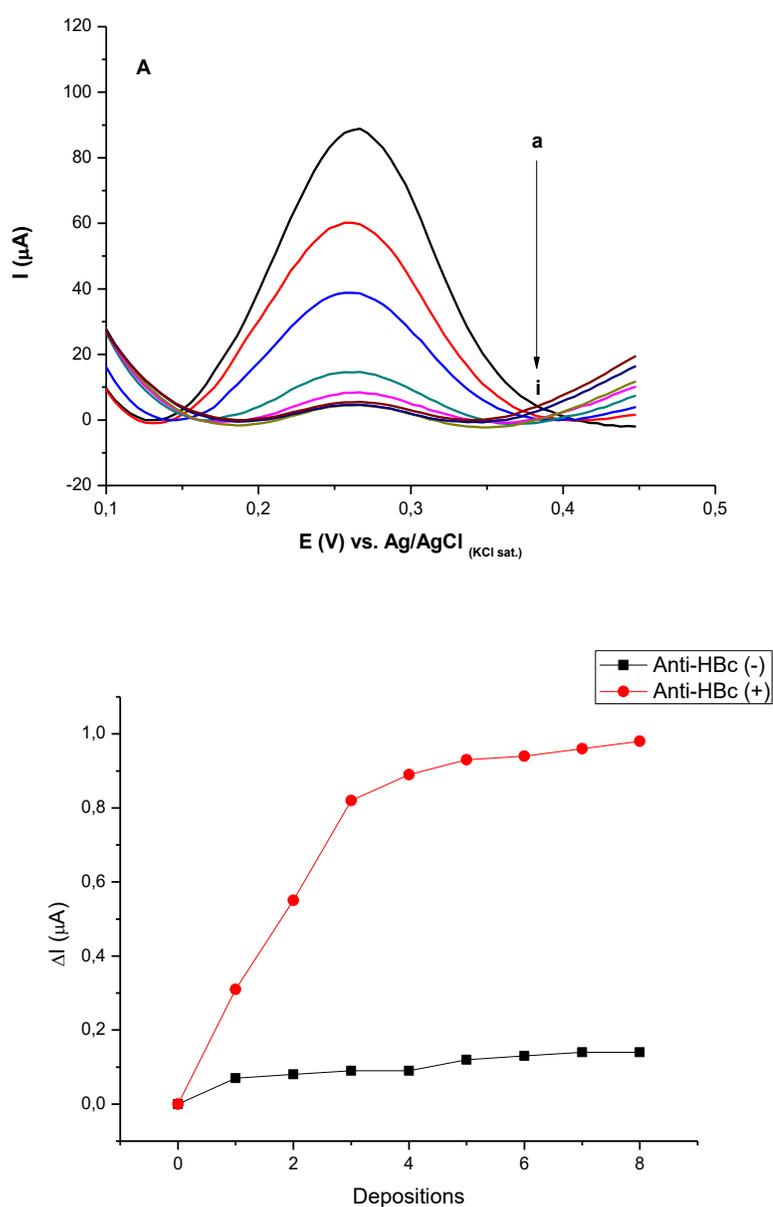
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Analytical responses to anti-HBc antibodies

After immobilization of the HBcAg antigens and glycine blocking on the electrode, it was taken to the analytical tests, which consisted of incubations with samples of solutions of anti-HBc antibodies prepared in PBS buffer ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.4). The electrode surface was incubated in one drop (3 uL) of anti-HBc solution (1.25 ng/ml) at room temperature for 30 min and submitted to the DPV measurements. In prior measurements, GCE/COOH-CNT/PPy/HBcAg GCEs were washed with PBS ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) and immersed in the electrochemical cell containing the $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) as support electrolyte. The calibration curve indicated a gradual decrease in DPV current peaks proportional to the increase of the anti-HBc concentrations as expected due to insulating nature of proteins that hinder the electronic transfer (Figure 5 (a)). The plot of analytical curve was obtained from difference between blank, and data was adjusted to a linear regression equation, a correlation coefficient of 0.977 was obtained. The amperometric responses were generated by the amplitude of anodic peaks.

The results showed a linear increase proportional to the concentration from 1.25 to 7.5 ng mL⁻¹ of anti-HBc. The data adjusted by linear regression equation $Y (I) = 0,1097 X + 136,74$, showed a correlation coefficient of 0.977 ($p < 0,05$, $n=7$). The limit of detection (LOD) for this prototype immunosensor was determined as 0,77 ng.mL⁻¹.

Figure 34 - Analytical responses at different concentrations of anti-HBc obtained in $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 mol L⁻¹) prepared in KCl (0,1 mol L⁻¹) as electrochemical probe: (A) a represent blank (HBcAg), b-i represent the curves of 1,25-7,5 ng.mL⁻¹ of anti-HBc. (B) Fit of relationship between ΔI and anti-HBc concentrations (presence and absence) in serological samples.



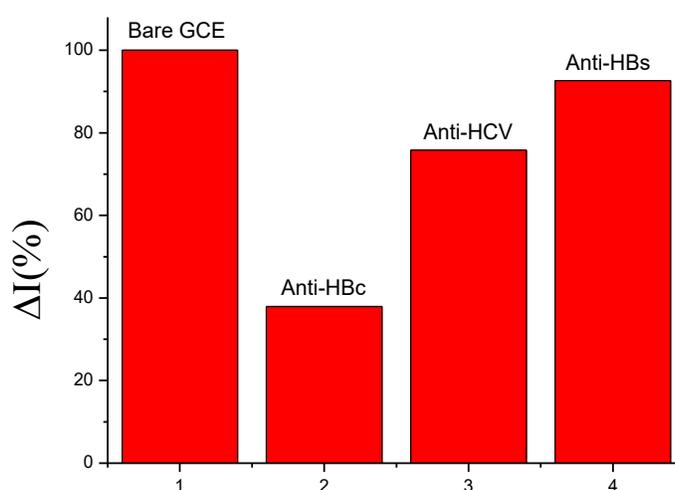
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Analytical performance and selectivity of immunosensor in serological samples

The analytical performance was evaluated by submitted the modified electrode to the successive additions of reagent and non-reagent real serum samples to the anti-HBc marker (Figure 5(b)). The response of the sensor was obtained by using the percentual decrease of current ($\Delta I\%$) of the DPVs

measurements in $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ($0,005\text{mol L}^{-1}$) after incubations steps. The absence of the anti-HBc in the immobilization matrix, was investigated with a control study. For selectivity investigation, different antibodies against viral hepatitis were used to test the specific property after exposure. To that end, three real clinical samples with anti-HCV, anti-HBs and anti-HBc exclusive seropositivity were used to demonstrate the practical ability of the present electrochemical immunoassay (Figure 6). Such biological specimens were previously tested by Cobas e411 Automated Immunoassay Analyzer (Roche Diagnostics) that is based on the ECLIA method.

Figure 35 - Selectivity test of electrochemical immunosensor toward some antibodies target of real samples of viral hepatitis.



Fonte: Elaborado pelo autor.

The specificity could be studied, since the blood is a highly complex matrix, composed of a diversity of components: proteins, lipids, cells, metabolites, endogenous electroactive species, among others. Blood serum fluid serves as a good standard for the evaluation of contaminants and interferents [23]. Target molecules, on the other hand, can change the number and mobility of charge carriers, which results in the overall change in conductivity, current, and impedance data [24]. The amperometric responses of the sample of a seronegative patient remained practically constant, whereas in the seropositive sample the signal intensity in the differential pulse voltammetry gradually increased. Therefore, it was observed that the difference of the peak currents from the blank shows a linear growth proportional to the anti-HBc incubations. Furthermore, nonspecific seromarkers had little effect on analytical responses. However, the highest sensing response occurred for the anti-HBc seropositive sample, certainly due to the formation of immunocomplexes due to more specific binding. Thus, this prototype could be used for investigation in suspect patients with good selectivity for anti-HBc and

satisfactory specificity to directly recognize serum samples.

4 Conclusions

The results indicate the good film stability and the excellent conductivity via VPP method compared to films grown by electropolymerization and in the methodology of the first scientific work. The findings demonstrate great opportunities for the development of a reliable label-free immunosensor to detect anti-HBc antibodies. Anti-HBc is considered the first-choice marker for donor screening and is recommended as a single test of blood bank for the economy of disposal of blood bags by hepatitis B contamination, since it indicates prior contact with the viral agent at any moment in life. It is intended to use the biosensor as a point-of-care device, and it is important to study the analytical response and optimization of the experimental conditions for improvement of the device, particularly in blood samples. In the future, this portable analytical tool could be used in the daily for screening of blood donors at Hematology Centers, in routine of others laboratories or outside their, mainly in diagnostic decentralization in more restricted geographic locations, expanding coverage areas to faithfully map the HBV prevalence. Cabral et al [26] reported another label-free electrochemical immunosensor for Hepatitis B, as yet untested in human biological fluids, based on hyaluronic acid-carbon nanotube hybrid film. However, here, it is described the new generation for ease of synthesis of nanocomposite films applicable to the conducting polymers, opening prospects of production of electrochemical immunosensors in large scale.

5 Acknowledgements

The authors are thankful the financial support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES). The research was supported by Foundation for Support to Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) and Cabral D. G. A. would like to thank this Brazilian agency for his scholarship (grant number X). The assistance of the Northeast Center for Strategic Technologies (CETENE) is also acknowledged.

6 Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

7 References

- [1] WHO, Global hepatitis report 2017, WHO. (2017) 1–83. <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/> (accessed September 7, 2017).
- [2] T. Mina, S. Amini Babil Olyaei, F. Tacke, P. Maes, M. Van Ranst, M.R. Pourkarim, Genomic Diversity of Hepatitis B Virus Infection Associated With Fulminant Hepatitis B Development, *Hepat. Mon.* 15 (2015) e29477. doi:10.5812/hepatmon.29477v2.
- [3] U.H. Yildiz, F. Inci, S. Wang, M. Toy, H.C. Tekin, A. Javaid, D.T.-Y. Lau, U. Demirci, Recent advances in micro/nanotechnologies for global control of hepatitis B infection, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 178–190. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.003.
- [4] P.J. Easterbrook, T. Roberts, A. Sands, R. Peeling, Diagnosis of viral hepatitis, *Curr. Opin. HIV AIDS.* 12 (2017) 302–314. doi:10.1097/COH.0000000000000370.
- [5] D.H. Seo, D.H. Whang, E.Y. Song, K.S. Han, Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion., *World J. Hepatol.* 7 (2015) 600–6. doi:10.4254/wjh.v7.i3.600.
- [6] A. Esposito, C. Sabia, C. Iannone, G.F. Nicoletti, L. Sommese, C. Napoli, Occult Hepatitis Infection in Transfusion Medicine: Screening Policy and Assessment of Current Use of Anti-HBc Testing., *Transfus. Med. Hemother.* 44 (2017) 263–272. doi:10.1159/000460301.
- [7] M. Heiat, R. Ranjbar, S.M. Alavian, Classical and modern approaches used for viral hepatitis diagnosis., *Hepat. Mon.* 14 (2014) e17632. doi:10.5812/hepatmon.17632.
- [8] C.-Y. Yao, W.-L. Fu, Biosensors for hepatitis B virus detection., *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 12485–92. doi:10.3748/wjg.v20.i35.12485.
- [9] Y.-P. Liu, C.-Y. Yao, Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus, *World J. Gastroenterol.* 21 (2015) 11954. doi:10.3748/wjg.v21.i42.11954.
- [10] Kong, Franklin, Zhou, Chapline, Peng, Cho, Dai, Nanotube molecular wires as chemical sensors, *Science.* 287 (2000) 622–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649989> (accessed November 17, 2017).
- [11] C.-M. Tilmaciu, M.C. Morris, Carbon nanotube biosensors., *Front. Chem.* 3 (2015) 59. doi:10.3389/fchem.2015.00059.
- [12] B.A.G. Rodriguez, E.K.G. Trindade, D.G.A. Cabral, E.C.L. Soares, C.E.L. Menezes, D.C.M. Ferreira, R.K. Mendes, R.F. Dutra, Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor, in: *Biosens. - Micro Nanoscale Appl.*, InTech, 2015. doi:10.5772/61149.
- [13] M.M. Rahman, M.J.A. Shiddiky, M.A. Rahman, Y.-B. Shim, A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film, *Anal. Biochem.* 384 (2009) 159–165. doi:10.1016/j.ab.2008.09.030.
- [14] R. Jain, N. Jadon, A. Pawaiyaa, Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 363–373. doi:10.1016/J.TRAC.2017.10.009.
- [15] D. Bhattacharyya, R.M. Howden, D.C. Borrelli, K.K. Gleason, Vapor phase oxidative synthesis of conjugated polymers and applications, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 50 (2012) 1329–1351. doi:10.1002/polb.23138.
- [16] R. Brooke, P. Cottis, P. Talemi, M. Fabretto, P. Murphy, D. Evans, Recent advances in the synthesis of conducting polymers from the vapour phase, *Prog. Mater. Sci.* 86 (2017) 127–146. doi:10.1016/J.PMATSCI.2017.01.004.
- [17] A.C.M.S. Dias, S.L.R. Gomes-Filho, M.M.S. 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. doi:10.1016/j.bios.2012.12.033.
- [18] Y. Yang, S. Li, L. Zhang, J. Xu, W. Yang, Y. Jiang, Vapor Phase Polymerization Deposition of Conducting Polymer/Graphene Nanocomposites as High Performance Electrode Materials, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 4350–4355. doi:10.1021/am4003815.
- [19] P. Saville, Polypyrrole: Formation and Use. Technical Memorandum., (2005) 50. <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a436284.pdf> (accessed May 2, 2019).
- [20] B. Sevil, K. Zuhail, Synthesis and Characterization of Polypyrrole Nanoparticles and Their Nanocomposites with Poly(propylene), *Macromol. Symp.* (2010) 59–64. doi:10.1002/masy.200900164.
- [21] D.A. Walters, M.J. Casavant, X.C. Qin, C.B. Huffman, P.J. Boul, L.M. Ericson, E.H. Haroz, M.J. O'Connell, K. Smith, D.T. Colbert, R.E. Smalley, In-plane-aligned membranes of carbon nanotubes, *Chem. Phys. Lett.* 338 (2001) 14–20. doi:10.1016/S0009-2614(01)00072-0.
- [22] P.D. Tam, N. Van Hieu, Conducting polymer film-based immunosensors using carbon nanotube/antibodies doped polypyrrole, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 9817–9824. doi:10.1016/J.APSUSC.2011.06.028.
- [23] G.S. Wilson, R. Gifford, Biosensors for real-time in vivo measurements, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2388–2403. doi:10.1016/j.bios.2004.12.003.
- [24] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1853–1859. doi:10.1016/J.MSEC.2013.01.035.

4 CONCLUSÃO

Ao final dessa tese observa-se que o método de crescimento de filmes poliméricos nanoestruturados por VPP consiste em uma técnica de escalonamento de produção caracterizada por sua simplicidade e praticidade para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos nanoestruturados. Além do mais, trata-se de um método bastante versátil que permite que diferentes substratos, incluindo não condutores, possam ser recobertos, abrindo a perspectiva de fabricação de sensores de baixo custo. Utilizando superfícies de vidro, papel e substratos maleáveis, caso do acetato, dispositivos abalizados podem ser projetados, sendo moldados na inovadora tecnologia dos sensores vestíveis.

Como prova de conceito, o filme nanocompósito de CNT e PPy foi aplicado para a detecção livre de marcação de anticorpos anti-HBc, um estratégico soromarcador de infecção da hepatite B. O emprego deste nanomaterial combinado ao polímero condutor possibilitou a construção de uma plataforma sensora com, ao menos, duas etapas de síntese, permitindo a imobilização e orientação dos antígenos HBcAg e melhorando o limite de detecção visto na curva de calibração. O sinergismo entre o nanotubo de carbono e o polipirrol aumentou em 340% a condutividade do biossensor em relação ao eletrodo não modificado. Assim, foi possível a obtenção de um limite de detecção de 0.77 ng/mL.

Os resultados mostraram-se promissores para um futuro imunossensor eletroquímico a fim de ser consolidado como um teste de pré-triagem de doadores de sangue em Centros de Hematologia e Hemoterapia. Ademais, pode ser considerada uma favorável ferramenta analítica para atender a necessidade de descentralização diagnóstica, fornecendo as estimativas epidemiológicas de combate mundial ao HBV. O fato é que nosso sistema nacional de vigilância requer a notificação compulsória dos casos de hepatite B, entretanto, sabe-se que esse dados do sistema de notificação a partir da vigilância não são suficientemente confiáveis para estimar as taxas de infecção na população. Aliado às grandes dimensões territoriais do Brasil, traçar um mapa de prevalência é uma tarefa particularmente difícil. Inquéritos sorológicos realizados em localidades geográficas mais restritas têm gerado informações mais precisas para os programas nacionais de controle, detalhando a respeito da existência de variações de regionais. Desse modo, ao lançar mão de dispositivos portáteis, a área de abrangência poderia ser ampliada para além dos Laboratórios Centrais ou unidades satélites circunscritos aos grandes centros urbanos, alcançando os interiores por meio de laboratórios locais ou unidades móveis.

Por fim, devido ao grande crescimento da nanotecnologia produzido nas últimas décadas, a apropriação do conhecimento permite projetar métodos analíticos cada vez mais arrojados e competitivos ao explorar as características dos nanomateriais de carbono, como a alta transferência de elétrons e fácil funcionalização para acoplar moléculas biológicas de interesse. Com a exigência por testes práticos e sensíveis, os biossensores são indicativamente uma alternativa insubstituível, os quais apontam estar em plena expansão, tendo em vista que seu agressivo mercado foi avaliado em 15,6 bilhões de dólares, crescendo a uma taxa de 7,9% ao ano.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, T. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791–805, 1 fev. 2007.
- ALIZADEH, N.; HALLAJ, R.; SALIMI, A. A highly sensitive electrochemical immunosensor for hepatitis B virus surface antigen detection based on Hemin/G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme-signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 184–192, 15 ago. 2017.
- ALMEIDA, J.; RUBENSTEIN, D.; STOTT, E. . New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. **The Lancet**, v. 298, n. 7736, p. 1225–1227, 4 dez. 1971.
- AMOUZADEH TABRIZI, M.; SHAMSIPUR, M.; MOSTAFAIE, A. A high sensitive label-free immunosensor for the determination of human serum IgG using overoxidized polypyrrole decorated with gold nanoparticle modified electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 965–969, fev. 2016.
- ANWER, M. S.; STIEGER, B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 1, p. 77–89, 3 jan. 2014.
- AQEL, A. et al. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2012.
- ARAÚJO, N. M. et al. High proportion of subgroup A? (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Archives of Virology**, v. 149, n. 7, p. 1383–1395, 5 jul. 2004.
- ASHOUR, M. E.; ATTEYA, R.; EL-KHAMISY, S. F. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 3, p. 137–151, 19 fev. 2015.
- ASPINALL, E. J. et al. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occupational Medicine**, v. 61, n. 8, p. 531–540, 1 dez. 2011.
- ATES, M.; SARAC, A. S. Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 66, n. 4, p. 337–358, dez. 2009.
- AUNG, M. N. et al. Observation of genotype C infected chronic hepatitis B patients in clinical practice. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 12, p. 882–889, 13 dez. 2011.
- AYDEMIR, N.; MALMSTRÖM, J.; TRAVAS-SEJDIC, J. Conducting polymer based electrochemical biosensors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 12, p. 8264–8277, 16 mar. 2016.
- BAR-GAL, G. K. et al. Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1671–1680, nov. 2012.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: Wiley, 2001.
- BARISCI, J. . et al. Characterisation and analytical use of a polypyrrole electrode containing anti-human serum albumin. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, n. 1, p. 39–48, 21 set. 1998.
- BARTENSCHLAGER, R.; SCHALLER, H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. **The EMBO journal**, v. 11, n. 9, p. 3413–20, set. 1992.

BARTHOLOMEUSZ, A.; GROENEN, L. C.; LOCARNINI, S. A. Clinical Experience with Famciclovir against Hepatitis B Virus. **Intervirolgy**, v. 40, n. 5–6, p. 337–342, 1997.

BAYLISS, J. et al. Advances in the Molecular Diagnosis of Hepatitis B Infection: Providing Insight into the Next Generation of Disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, n. 02, p. 113–121, 8 jun. 2013.

BEESON, P. B. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. **Journal of the American Medical Association**, v. 121, n. 17, p. 1332, 24 abr. 1943.

BENNETT, J. E. et al. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8. ed. New York: Elsevier, 2014.

BERNAL, W. et al. Acute liver failure. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9736, p. 190–201, 17 jul. 2010.

BHARECH, S.; KUMAR, R. **A Review on the Properties and Applications of Graphene** *Journal of Material Science and Mechanical Engineering (JMSME)*, , 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/303896294_A_Review_on_the_Properties_and_Applications_of_Graphene>. Acesso em: 29 maio. 2018

BHATTACHARYYA, D. et al. Vapor phase oxidative synthesis of conjugated polymers and applications. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 50, n. 19, p. 1329–1351, 1 out. 2012.

BLOCK, T. M.; GUO, H.; GUO, J.-T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 4, p. 685–706, vii, nov. 2007.

BLUMBERG, B. S. et al. A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, Leukemia, and Hepatitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 66, n. 5, p. 924, 1 maio 1967.

BLUMBERG, B. S. The Curiosities of Hepatitis B Virus Prevention, Sex Ratio, and Demography. **Proc Am Thorac Soc.**, v. 3, n. 1, p. 14–20, 2006.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J. A New Antigen in Leukemia Sera. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 191, n. 7, p. 541, 15 fev. 1965.

BOCK, C. T. et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 183–196, 16 mar. 2001.

BOTT, A. W. Practical Problems in Voltammetry: 4. Preparation of Working Electrodes. **Current Separations**, v. 16, n. 3, p. 1–5, 1997.

BRASIL. **Hepatites virais: o Brasil está atento** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_virais_brasil_atento_3ed.pdf>. Acesso em: 18 maio. 2017

BRASIL. **A B C D E do Diagnóstico para as Hepatites Virais** Brasília, DF Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, , 2009. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/ABCDE_guia_bolso_menor.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2017

BRASIL. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <www.saude.gov.br/bvs>. Acesso em: 18 maio. 2017

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**, p. 101, 2016.

- BRASIL. Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV)**, v. 49, n. 31, p. 1–72, 2018.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry : principles, methods, and applications**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1993.
- BROOKE, R. et al. Recent advances in the synthesis of conducting polymers from the vapour phase. **Progress in Materials Science**, v. 86, p. 127–146, 1 maio 2017.
- BRUNETTO, M. R. et al. Hepatitis B Surface Antigen Serum Levels Help to Distinguish Active From Inactive Hepatitis B Virus Genotype D Carriers. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 483–490, ago. 2010.
- BRUSS, V.; GERLICH, W. H. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. **Virology**, v. 163, n. 2, p. 268–75, abr. 1988.
- BUTI, M. et al. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 34 Suppl 1, p. S79-82, dez. 2005.
- CABRAL, D. G. A. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de anticorpos dirigidos contra proteína do nucleocapsídeo vírico da hepatite b**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular aplicada), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 51p., 2014.
- CAMPOS, R. H.; MBAYED, V. A.; PINEIRO Y LEONE, F. G. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 34 Suppl 2, p. S8–S13, dez. 2005.
- CANBAY, A. et al. Acute Liver Failure in a Metropolitan Area in Germany: a Retrospective Study (2002 – 2008). **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 47, n. 09, p. 807–813, 11 set. 2009.
- CANDIAN, L. M. **Estudo do polietileno de alta densidade reciclado para uso em elementos estruturais**. São Carlos: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 19 set. 2007.
- CARMAN, W. F. et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8663, p. 588–91, 9 set. 1989.
- CDC. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases**. 13. ed. Washington D.C: Public Health Foundation, 2015.
- CHANG, M.-H. Natural history and clinical management of chronic hepatitis B virus infection in children. **Hepatol Int.**, v. 2, p. 28–36, 2008.
- CHANG, M. H. et al. Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: clinical and liver histologic studies. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 8, n. 2, p. 374–7, 1988.
- CHEVALIEZ, S.; RODRIGUEZ, C.; PAWLOTSKY, J.-M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1303–1313.e1, maio 2012.
- CHU, C.-M. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 5 (Suppl.), p. E25–E30, 1 maio 2000.
- CHU, C.; HUSSAIN, M.; LOK, A. S. F. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, v. 36, n. 6, p. 1408–1415, dez. 2002.

CHUDY, M. et al. Performance of hepatitis B surface antigen tests with the first WHO international hepatitis B virus genotype reference panel. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 47–53, set. 2013.

CHUNG, C. et al. Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 10, p. 2211–2224, 15 out. 2013.

COLEMAN, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 198–203, fev. 2006.

CORNBERG, M. et al. Aktualisierung der S3 Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. **Z Gastroenterol**, v. 49, p. 871–930, 2011.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, p. 801–814, 1 jan. 2016.

COWIE, B. C.; CARVILLE, K. S.; MACLACHLAN, J. H. **Mortality due to viral hepatitis in the Global Burden of Disease Study 2010: New evidence of an urgent global public health priority demanding action** *Antiviral Therapy*, 2013.

CROAGH, C. M. N.; LUBEL, J. S. Natural history of chronic hepatitis B: phases in a complex relationship. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10395–404, 14 ago. 2014.

DANDRI, M. et al. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. **Hepatology**, v. 35, n. 1, p. 217–223, jan. 2002.

DANDRI, M.; LOCARNINI, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 61, n. Suppl 1, p. i6–i17, 12 maio 2012.

DANDRI, M.; PETERSEN, J. Hepatitis B virus cccDNA clearance: Killing for curing? **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1453–1455, dez. 2005.

DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. **The Lancet**, v. 295, n. 7649, p. 695–698, 4 abr. 1970.

DANIEL, H. D.-J.; TORBENSON, M. Transgenic hepatitis B: a new model of HBV infection. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2610, 1 jun. 2017.

DASGUPTA, A. et al. Covalent three-dimensional networks of graphene and carbon nanotubes: synthesis and environmental applications. **Nano Today**, v. 12, p. 116–135, 2017.

DEISENHAMMER, S. et al. Needlestick injuries during medical training. **J Hosp Infect**, v. 63, n. 3, p. 263–267, 2006.

DEKANSKI, A. et al. Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, n. 8, p. 1195–1205, 1 jul. 2001.

DI CRESCENZO, A.; ETTORRE, V.; FONTANA, A. Non-covalent and reversible functionalization of carbon nanotubes. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 5, p. 1675–90, 2014.

DIAS, A. C. M. S. et al. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216–221, 15 jun. 2013.

DIENSTAG, J. L. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 14, p. 1486–1500, 2 out. 2008.

DOLATABADI, J. E. N.; GUARDIA, M. DE LA. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors

as advanced diagnostic tools. **Anal. Methods**, v. 6, n. 12, p. 3891–3900, 29 maio 2014.

DREYER, D. R. et al. The chemistry of graphene oxide. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 228–240, 14 dez. 2010.

DUCHESNE, L.; LACOMBE, K. Innovative technologies for point-of-care testing of viral hepatitis in low-resource and decentralized settings. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 25, n. 2, p. 108–117, fev. 2018.

DUNG, N. Q. et al. An amperometric glucose biosensor based on a GOx-entrapped TiO₂–SWCNT composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 166–167, p. 103–109, maio 2012.

EASTERBROOK, P. J. et al. Diagnosis of viral hepatitis. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 3, p. 302–314, maio 2017.

EL-DESSOUKY, R.; GEORGES, M.; AZZAZY, H. M. E. Silver Nanostructures: Properties, Synthesis, and Biosensor Applications. In: [s.l: s.n.]. p. 359–404.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 13 fev. 2018.

ENGELKE, M. et al. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. **Hepatology**, v. 43, n. 4, p. 750–760, abr. 2006.

ESPOSITO, A. et al. Occult Hepatitis Infection in Transfusion Medicine: Screening Policy and Assessment of Current Use of Anti-HBc Testing. **Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie**, v. 44, n. 4, p. 263–272, ago. 2017.

ESTÉVEZ, V.; VILLACAMPA, M.; MENÉNDEZ, J. C. Multicomponent reactions for the synthesis of pyrroles. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4402, 19 out. 2010.

FARKA, Z. et al. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 15, p. 9973–10042, 9 ago. 2017.

FARRELL, G. Hepatitis B e antigen seroconversion: Effects of lamivudine alone or in combination with interferon alpha. **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 3, p. 374–379, 1 jul. 2000.

FELD, J. J. Hepatitis B Reactivation: The Controversies Continue. **Digestive Diseases**, v. 35, n. 4, p. 351–358, 2017.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137–142, fev. 2006.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

FLAUM, A. et al. Eine nosocomiale Ikterus-Epidemie. **Acta Medica Scandinavica**, v. 64, n. S16, p. 544–553, 24 abr. 2009.

FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

FONSECA, J. C. F. **Eradication of Hepatitis B virus infection in the State of Amazonas - 2007** Newsletter of World Gastroenterology Organization, 2007.

FONSECA, J. C. F. Histórico das hepatites virais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 43, n. 3, p. 322–330, 2010.

FOY, M. C. et al. False-negative hepatitis B virus (HBV) surface antigen in a vaccinated dialysis patient with a high level of HBV DNA in the United States. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 5, p. 820–2, maio 2012.

FREITAS, T. DE A. **Desenvolvimento de eletrodos baseados em carbono para determinação da troponina T cardíaca humana**. [s.l.] Tese (Doutorado em Biotecnologia - Renorbio), Universidade Federal de Pernambuco, 100p., 2014.

FRIED, M. W. et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 428–434, 7 jan. 2008.

GAJER, M. et al. Few basepairing-independent motifs in the apical half of the avian HBV ϵ RNA stem-loop determine site-specific initiation of protein-priming. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7120, 2 dez. 2017.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1118–1129, 11 mar. 2004.

GANEM, D.; VARMUS, H. E. The Molecular Biology of the Hepatitis B Viruses. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 651–693, jun. 1987.

GAO, C. et al. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948, 1 mar. 2012.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183–191, 1 mar. 2007.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345–359, 1 maio 2002.

GERLICH, W. H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 239, 2013.

GHASEMI, A. et al. Carbon nanotubes in microfluidic lab-on-a-chip technology: current trends and future perspectives. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 9, p. 1–19, 2017.

GIRIFALCO, L. A.; HODAK, M.; LEE, R. S. Carbon nanotubes, buckyballs, ropes, and a universal graphitic potential. **Physical Review B**, v. 62, n. 19, p. 13104–13110, 15 nov. 2000.

GITLIN, N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 8 Pt 2, p. 1500–6, ago. 1997.

GLEBE, D.; URBAN, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 22–38, 7 jan. 2007.

GOPINATH, S. C. B. et al. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302, 15 jul. 2014.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S. Surface modification in electroanalysis: Past, present and future. **Indian Journal of Chemistry**, v. 51, p. 205–225, 2012.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 7 mar. 2008.

GRIPON, P. et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15655–15660, 26 nov. 2002.

GRIPON, P.; CANNIE, I.; URBAN, S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1613–1622, 1 fev. 2005.

GUBALA, V. et al. Point of Care Diagnostics: Status and Future. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 487–515, 17 jan. 2012.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 876–921, ago. 2007.

GUIRGIS, B. S. S.; ABBAS, R. O.; AZZAZY, H. M. E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e941-53, 1 nov. 2010.

GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 687–703, 1 mar. 2018.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

HASAN, A. et al. Recent Advances in Application of Biosensors in Tissue Engineering. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

HAUN, J. B. et al. Magnetic nanoparticle biosensors. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 3, p. 291–304, maio 2010.

HEIAT, M.; RANJBAR, R.; ALAVIAN, S. M. Classical and modern approaches used for viral hepatitis diagnosis. **Hepatitis monthly**, v. 14, n. 4, p. e17632, abr. 2014.

HEIJTINK, R. A. et al. Serum HBeAg quantitation during antiviral therapy for chronic hepatitis B. **Journal of medical virology**, v. 53, n. 3, p. 282–7, nov. 1997.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratorais**. 21. ed. [s.l.] MANOLE, 2012.

HERMANSON, G. T.; PRECEDED BY: HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. Third Edition ed. [s.l.] Academic Press, 2013.

HIRST, E. R. et al. Bond-rupture immunosensors—A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1759–1768, 15 jul. 2008.

HOFFMANN, J. et al. Identification of α -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 934–941, nov. 2013.

HOLLER, F. J. et al. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.

HOLZINGER, M.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 63, 2014.

HOOFNAGLE, J. H. et al. Antibody to Hepatitis B Core Antigen. **New England Journal of Medicine**, v. 290, n. 24, p. 1336–1340, 13 jun. 1974.

HU, C.; HU, S. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensors: Principles and Applications in Biomedical Systems. **Journal of Sensors**, v. 2009, p. 1–40, 9 jul. 2009.

HU, P. et al. Carbon Nanostructure-Based Field-Effect Transistors for Label-Free Chemical/Biological Sensors. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 5133–5159, 25 maio 2010.

- ILOEJE, U. H. et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 678–86, 1 mar. 2006.
- INCI, F. et al. Multitarget, quantitative nanoplasmonic electrical field-enhanced resonating device (NE²RD) for diagnostics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 32, p. E4354–E4363, 11 ago. 2015.
- JAIN, R.; JADON, N.; PAWAIYAA, A. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 363–373, 1 dez. 2017.
- JAYAKUMAR, S. et al. Fulminant Viral Hepatitis. **Critical Care Clinics**, v. 29, n. 3, p. 677–697, jul. 2013.
- JOHNSON, D. W.; DOBSON, B. P.; COLEMAN, K. S. A manufacturing perspective on graphene dispersions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 20, n. 5–6, p. 367–382, 1 out. 2015.
- 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 & bioelectronics**, v. 42, p. 273–9, 15 abr. 2013.
- KANG, Q.; YANG, L.; CAI, Q. An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt–Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 62–65, nov. 2008.
- KANG, X. et al. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. **Analytical Biochemistry**, v. 369, n. 1, p. 71–79, 1 out. 2007.
- KANN, M. et al. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. **The Journal of cell biology**, v. 145, n. 1, p. 45–55, 5 abr. 1999.
- KAO, J.-H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. **The Korean journal of internal medicine**, v. 26, n. 3, p. 255–61, set. 2011.
- KENNEY, J. M. et al. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. **Structure (London, England : 1993)**, v. 3, n. 10, p. 1009–19, 15 out. 1995.
- KHAN, M. S. et al. Paper-Based Analytical Biosensor Chip Designed from Graphene-Nanoplatelet-Amphiphilic-diblock-*co*-Polymer Composite for Cortisol Detection in Human Saliva. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 2107–2115, 7 fev. 2017.
- KIZEK, R. et al. Nanoscale virus biosensors: state of the art. **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**, v. 4, p. 47, 6 ago. 2015.
- KOBAYASHI, M. et al. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 9, p. 844–850, set. 2004.
- KÖNIGER, C. et al. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. E4244–E4253, 7 out. 2014.
- KORBA, B. E. et al. Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. **Journal of virology**, v. 63, n. 3, p. 1360–70, mar. 1989.
- KRISHNA, K. S. et al. **Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013.

KUMAR, R.; SINGH, S.; YADAV, B. C. Conducting Polymers: Synthesis, Properties and Applications. **International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology**, v. 2, n. 11, p. 1–15, 2015.

KUMAR, S. et al. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 498–503, 15 ago. 2015.

KUMAR, S. K. et al. *50th Anniversary Perspective* : Are Polymer Nanocomposites Practical for Applications? **Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 714–731, 14 fev. 2017.

LA'ULU, S. L.; ROBERTS, W. L. The Analytic Sensitivity and Mutant Detection Capability of Six Hepatitis B Surface Antigen Assays. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 125, n. 5, p. 748–751, 1 maio 2006.

LANFORD, R. E. et al. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 10, p. 5757–61, 12 maio 1998.

LARSON, A. M. Diagnosis and management of acute liver failure. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 3, p. 214–221, 1 maio 2010.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 2, p. 97–107, mar. 2004.

LAWAL, A. T. Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors. **Talanta**, v. 131, p. 424–443, 1 jan. 2015.

LEE, C. et al. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, p. 328–36, 2006.

LEE, W. M. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 24, p. 1733–1745, 11 dez. 1997.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1–2, p. 200–210, 24 maio 2006.

LENTZ, T. B.; LOEB, D. D. Roles of the envelope proteins in the amplification of covalently closed circular DNA and completion of synthesis of the plus-strand DNA in hepatitis B virus. **Journal of virology**, v. 85, n. 22, p. 11916–27, nov. 2011.

LEVRERO, M. et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 3, p. 581–592, set. 2009.

LI, J.; PANDEY, G. P. Advanced Physical Chemistry of Carbon Nanotubes. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 331–356, abr. 2015.

LI, M. et al. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 31–44, 13 jul. 2012.

LI, M. et al. Highly sensitive immunosensor for Hepatitis B surface antigen detection based on a novel signal amplification system of gold nanorods and mesoporous Au@Pd@Pt core-shell nanospheres. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 809, p. 14–21, 15 jan. 2018.

LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 7, p. 1756–1789, 10 fev. 2014.

LI, T.; YANG, M.; LI, H. Label-free electrochemical detection of cancer marker based on graphene—

cobalt hexacyanoferrate nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 50–55, maio 2011.

LI, W.; URBAN, S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 1, p. S32–S40, abr. 2016.

LI, Y. et al. An electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of HBsAg based on platinum nanoparticles loaded on natural montmorillonite. **Analytical Methods**, v. 7, n. 21, p. 9150–9157, 22 out. 2015.

LI, Y.; SCHLUESENER, H. J.; XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bulletin**, v. 43, n. 1, p. 29–41, mar. 2010.

LIAW, Y. F. et al. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 13, n. 4, p. 627–31, abr. 1991.

LIEBANA, S.; DRAGO, G. A. Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 59–68, 30 jun. 2016.

LIN, C.-L.; KAO, J.-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 123–130, jan. 2011.

LIU, C.-J.; KAO, J.-H. Global Perspective on the Natural History of Chronic Hepatitis B: Role of Hepatitis B Virus Genotypes A to J. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, n. 02, p. 097-102, 8 jun. 2013.

LIU, Y.-P.; YAO, C.-Y. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 42, p. 11954, 14 nov. 2015.

LIU, Z. et al. Multiplexed Five-Color Molecular Imaging of Cancer Cells and Tumor Tissues with Carbon Nanotube Raman Tags in the Near-Infrared. **Nano research**, v. 3, n. 3, p. 222–233, 1 jan. 2010.

LOCARNINI, S. et al. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 1, p. S76–S86, 2015.

LOCARNINI, S.; MASON, W. S. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 2, p. 422–431, fev. 2006.

LOCARNINI, S.; ZOULIM, F. Molecular genetics of HBV infection. **Antiviral Therapy**, v. 15, n. Suppl 3, p. 3–14, 2010.

LOK, A. S.-F. Hepatitis B infection: Pathogenesis and management. **Journal of Hepatology**, v. 32, p. 89–97, jan. 2000.

LOK, A. S. F.; MCMAHON, B. J. Chronic Hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1225–1241, 2001.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, dez. 2006.

LU, F. et al. Advances in Bioapplications of Carbon Nanotubes. **Advanced Materials**, v. 21, n. 2, p. 139–152, 12 jan. 2009.

LU, P.-X.; ZHOU, B.-P. **Diagnostic imaging of emerging infectious diseases**. 1. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2016.

LU, X. et al. Electrochemical biosensing platform based on amino acid ionic liquid functionalized

- graphene for ultrasensitive biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 134–139, 15 dez. 2014.
- LUCIFORA, J. et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 5, p. 996–1003, nov. 2011.
- LUTGEHETMANN, M. et al. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. **Hepatology**, v. 52, n. 1, p. 16–24, jul. 2010.
- LUTWICK, L. I.; ROBINSON, W. S. DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction. **Journal of virology**, v. 21, n. 1, p. 96–104, jan. 1977.
- LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nanomaterials for Biosensors and Implantable Biodevices. In: **Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 27–48.
- MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231–240, mar. 2004.
- MACLACHLAN, J. H.; COWIE, B. C. Hepatitis B virus epidemiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2015.
- MAGNIUS, L. O.; ESPMARK, A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology**, v. 80, n. 2, p. 335–7, 1972.
- MALEKZAD, H. et al. Noble metal nanoparticles in biosensors: recent studies and applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 301–329, 27 jan. 2017.
- MAMANI, J. B. **Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2 jul. 2009.
- MARGOLIS, H. S. et al. Prevention of Hepatitis B Virus Transmission by Immunization. **JAMA**, v. 274, n. 15, p. 1201, 18 out. 1995.
- MARUYAMA, T. et al. Distinguishing between acute and symptomatic chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 1006–15, abr. 1994.
- MAUSS, S. et al. **Hepatology – A clinical textbook**. 8. ed. Hamburg: [s.n.].
- MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 7, p. 62–77, 2012.
- MEIER, A. et al. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 31–42, 1 jul. 2013.
- MELLO, F. C. A. et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC microbiology**, v. 7, p. 103, 23 nov. 2007.
- MÉNARD-MOYON, C. et al. Functionalized Carbon Nanotubes for Probing and Modulating Molecular Functions. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 2, p. 107–115, fev. 2010.
- MENEZES, C. E. L. **Desenvolvimento de nanoimunossensor capacitado interdigitado para detecção de anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade Federal de Pernambuco. 75p., 2014.
- MERUM, S.; VELURU, J. B.; SEERAM, R. Functionalized carbon nanotubes in bio-world:

Applications, limitations and future directions. **Materials Science and Engineering: B**, v. 223, p. 43–63, 1 set. 2017.

MILICH, D. R. et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 17, p. 6599–603, set. 1990.

MILICH, D. R. et al. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 4, p. 2013–21, 15 fev. 1998.

MINA, T. et al. Genomic Diversity of Hepatitis B Virus Infection Associated With Fulminant Hepatitis B Development. **Hepatitis Monthly**, v. 15, n. 6, p. e29477, 23 jun. 2015.

MITCHELL, T. et al. The Increasing Burden of Imported Chronic Hepatitis B — United States, 1974–2008. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–6, 2011.

MIYAKAWA, Y.; OKAMOTO, H.; MAYUMI, M. The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative infections. **Journal of viral hepatitis**, v. 4, n. 1, p. 1–8, jan. 1997.

MORAES, S. B. DE; BOTAN, R.; LONA, L. M. F. Síntese e caracterização de nanocompósitos de poliestireno/hidroxissal lamelar. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 18–21, 2014.

MULCHANDANI, A.; MYUNG, N. V. Conducting polymer nanowires-based label-free biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 502–508, ago. 2011.

MURRAY, J. M.; PURCELL, R. H.; WIELAND, S. F. The half-life of hepatitis B virions. **Hepatology**, v. 44, n. 5, p. 1117–1121, nov. 2006.

NAG, A.; MITRA, A.; MUKHOPADHYAY, S. C. Graphene and its sensor-based applications: A review. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 270, p. 177–194, 1 fev. 2018.

NASSAL, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. **Gut**, v. 64, n. 12, p. 1972–1984, dez. 2015.

NEBBIA, G.; PEPPA, D.; MAINI, M. K. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. **QJM.**, v. 105, n. 2, p. 109–13, 2012.

NELSON, N. P.; EASTERBROOK, P. J.; MCMAHON, B. J. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 20, n. 4, p. 607–628, nov. 2016.

NGUYEN, T.; DESMOND, P.; LOCARNINI, S. The role of quantitative hepatitis B serology in the natural history and management of chronic hepatitis B. **Hepatology international**, v. 3, n. Suppl 1, p. 5–15, dez. 2009.

NKONGOLO, S. et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 723–731, abr. 2014.

NOEL, M.; ANANTHARAMAN, P. N. Voltammetric studies on a glassy carbon electrode. Part II. Factors influencing the simple electron-transfer reactions—the K₃[Fe(CN)₆]-K₄[Fe(CN)₆] system. **The Analyst**, v. 110, n. 9, p. 1095–1103, 1 jan. 1985.

OKAMOTO, H. et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. **Journal of virology**, v. 68, n. 12, p. 8102–10, dez. 1994.

OKOCHI, K.; MURAKAMI, S. Observations on Australia Antigen in Japanese. **Vox Sanguinis**, v. 15, n. 5, p. 374–385, 1 nov. 1968.

OLIO, A. D. et al. **Electron paramagnetic resonance and conductivity of an electrolytic oxypyrrole [(pyrrole polymer)] black**. C. R. Acad Sci., , 1968. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=0RHNYMQmOVsC&pg=PA523&lpg=PA523&dq=Electron+paramagnetic+resonance+and+conductivity+of+an+electrolytic+oxypyrrole+%5Bpyrrole+polymer%5D+black++1968&source=bl&ots=5RWzTmAtDu&sig=6KhRcrftLG03pMQBRyzTUrvZqNA&hl=pt-BR&as_scp=1>. Acesso em: 3 jul. 2018

OLIVEIRA, J. E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 81, p. 1–11, 2013.

OSTERYOUNG, J. G.; SCHREINER, M. M. Recent Advances in Pulse Voltammetry. **C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 19, n. sup1, p. S1–S27, jan. 1988.

OTT, J. J. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212–2219, 2012.

PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. **The Analyst**, v. 133, n. 7, p. 846, jul. 2008.

PAN, C. Q. et al. Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission in Mothers with High Viral Load. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 24, p. 2324–2334, 16 jun. 2016.

PAPASTERGIOU, V. et al. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. **Current Hepatology Reports**, v. 14, n. 3, p. 171–178, 17 set. 2015.

PARASKEVIS, D. et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. **Journal of virological methods**, v. 103, n. 2, p. 201–12, 16 maio 2002.

PARK, B.-W.; YOON, D.-Y.; KIM, D.-S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 1–10, 15 set. 2010.

PARK, C.; LEE, C.; KWON, O. Conducting Polymer Based Nanobiosensors. **Polymers**, v. 8, n. 7, p. 249, 30 jun. 2016.

PEELING, R. W. et al. The future of viral hepatitis testing: innovations in testing technologies and approaches. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. S1, p. 699, 1 nov. 2017.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. DE S.; KUBOTA, L. T. **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. **Quim. Nova**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n6a/12778.pdf>>. Acesso em: 9 set. 2018.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 2, p. 240–7, ago. 2009.

PERNAMBUCO. **Perfil Socioeconômico, Demográfico e Epidemiológico: Pernambuco 2016**. Recife: Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde, , 2016. Disponível em:

<http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/perfil_socioeconomico_demografico_e_epidemiologico_de_pernambuco_2016.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2018

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2014.

- PIAO, M.-H. et al. Label-Free Detection of Bisphenol A Using a Potentiometric Immunosensor. **Electroanalysis**, v. 20, n. 1, p. 30–37, 1 jan. 2008.
- PICHOUD, C. et al. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. **Hepatology**, v. 29, n. 1, p. 230–237, 1 jan. 1999.
- PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848–5866, 1 ago. 2008.
- POMMIER, Y. et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). **DNA repair**, v. 19, p. 114–29, jul. 2014.
- POURKARIM, M. R. et al. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7152–68, 21 jun. 2014.
- PRINCE, A. M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 60, n. 3, p. 814–21, jul. 1968.
- PRINCE, A. M. Relation between SH and Australia Antigens. **New England Journal of Medicine**, v. 280, n. 11, p. 617–618, 13 mar. 1969.
- PUJOL, F. H. et al. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. **Cancer letters**, v. 286, n. 1, p. 80–8, 1 dez. 2009.
- PULT, I. et al. Identification and Analysis of a New Hepadnavirus in White Storks. **Virology**, v. 289, n. 1, p. 114–128, out. 2001.
- PURDY, M. A. Hepatitis B virus S gene escape mutants. **Asian journal of transfusion science**, v. 1, n. 2, p. 62–70, jul. 2007.
- QIU, J.-D. et al. A label-free amperometric immunosensor based on biocompatible conductive redox chitosan-ferrocene/gold nanoparticles matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 852–857, dez. 2009.
- QIU, J.-D.; HUANG, H.; LIANG, R.-P. Signal-Enhanced Amperometric Immunosensor Based on Ferrocene-Branched Poly(allylamine)/Multiwalled Carbon Nanotubes Redox-Active Composite. **Electroanalysis**, v. 23, n. 8, p. 1975–1983, 1 ago. 2011.
- RABE, B.; GLEBE, D.; KANN, M. Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. **Journal of virology**, v. 80, n. 11, p. 5465–73, 1 jun. 2006.
- RACCICHINI, R. et al. The role of graphene for electrochemical energy storage. **Nature Materials**, v. 14, n. 3, p. 271–279, 2015.
- RAHMAN, M. M. et al. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4855–4886, 12 maio 2010.
- RAIMONDI, S. et al. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 441–449, mar. 2010.
- REUBEN, A. The thin red line. **Hepatology**, v. 36, n. 3, p. 770–773, 30 dez. 2003.
- RIBEIRO, J. F. F. **Plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo**

- modificada por pontos quânticos.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- RICCARDI, C. DOS S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.
- RICCI, F. et al. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, n. 2, p. 111–129, 19 dez. 2007.
- RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.
- ROBINSON, W. S.; MILLER, R. H.; MARION, P. L. Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. **Hepatology**, v. 7, n. S1, p. 64S–73S, 1 jan. 1987.
- RODOVALHO, V. R. et al. Biosensors Applied to Diagnosis of Infectious Diseases – An Update. **Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 1, n. 3, p. 1–12, 2015.
- RODRIGUEZ, B. A. G. et al. Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor. In: RINKEN, T. (Ed.). **Biosensors - Micro and Nanoscale Applications**. [s.l.] InTech, 2015. p. 29.
- SABOURI, S. et al. A gold nanoparticle-based immunosensor for the chemiluminescence detection of the hepatitis B surface antigen. **Anal. Methods**, v. 6, n. 14, p. 5059–5066, 26 jun. 2014.
- SADEGH, H. Development of graphene oxide from graphite: A review on synthesis, characterization and its application in wastewater treatment. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 49, p. 38–43, 2017.
- SANTANA, G. M. DE. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos baseados em agarose com a incorporação de ciprofloxacina para utilização como novo substituto temporário de pele.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 20 fev. 2015.
- SANTANA, L. K. L. et al. Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 31–41, 2017.
- SANTOS, J. C. DE C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores.** [s.l.] Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 94 p., 2012.
- SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- SCHAEFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 14–21, 7 jan. 2007.
- SCHEIBLAUER, H. et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. **Vox sanguinis**, v. 98, n. 3 Pt 2, p. 403–14, abr. 2010.
- SCHMITZ, A. et al. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000741, 29 jan. 2010.
- SCHÖDEL, F. et al. Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1332–7, 15 jan. 1993.
- SCHULZE, A. et al. Fine Mapping of Pre-S Sequence Requirements for Hepatitis B Virus Large Envelope Protein-Mediated Receptor Interaction. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1989–2000, 15 fev.

2010.

SCHULZE, A.; GRIPON, P.; URBAN, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. **Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1759–1768, 1 dez. 2007.

SEEFF, L. B. et al. A Serologic Follow-up of the 1942 Epidemic of Post-Vaccination Hepatitis in the United States Army. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 16, p. 965–970, 16 abr. 1987.

SEEGER, C.; GANEM, D.; VARMUS, H. E. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 232, n. 4749, p. 477–84, 25 abr. 1986.

SELZER, L.; ZLOTNICK, A. Assembly and Release of Hepatitis B Virus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 12, p. a021394, 9 nov. 2015.

SEO, D. H. et al. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 3, p. 600–6, 27 mar. 2015.

SERVANT-DELMAS, A. et al. Comparative Performance of Three Rapid HBsAg Assays for Detection of HBs Diagnostic Escape Mutants in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3954–3955, dez. 2015.

SHEPARD, C. W. et al. Epidemiology of hepatitis B and hepatitis B virus infection in United States children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, n. 9, p. 755–60, set. 2005.

SHEPARD, C. W. et al. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. **Epidemiologic Reviews**, v. 28, n. 1, p. 112–125, 1 jun. 2006.

SHIM, M.; HAN, S.-H. B. **Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B**. **Hepatitis B Annual** Kalinga Gastroenterology Foundation, , 2004. Disponível em: <<http://www.hepatitisbannual.org/article.asp?issn=0972-9747;year=2006;volume=3;issue=1;spage=128;epage=154;aualast=Shim>>. Acesso em: 11 jun. 2017

SHRIVASTAVA, S.; JADON, N.; JAIN, R. Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 55–67, set. 2016.

SILVA, M. M. S. DA. **Contribuição de nanomateriais no desenvolvimento de biossensores para diagnóstico da infecção aguda do dengue**. [s.l.] Tese (Doutorado em Biotecnologia - Renorbio). Universidade Federal de Pernambuco., 31 jan. 2014.

SILVA, M. M. S. et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 194–200, jan. 2015.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SKOTHEIM, T. A.; REYNOLDS, J. R. **Handbook of conducting polymers**. 3. ed. New York: CRC Press, 2007.

SOARES, E. C. L. **Desenvolvimento de testes diagnósticos para hepatite B baseados em imunossensores**. [s.l.] Tese (Doutorado em Biotecnologia-RENORBIO). Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433–40, 2006.

- SOUZA, D. et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, out. 2004.
- SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, jan. 2003.
- SOUZA, P. V. V. **Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados. Tese - Doutorado em Ciências Biológicas -**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- SPAIN, E. et al. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2613–2618, 15 jan. 2011.
- SPRENGEL, R.; KALETA, E. F.; WILL, H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. **Journal of virology**, v. 62, n. 10, p. 3832–9, out. 1988.
- SRIKANTH RANGANATHAN; TZU-CHI KUO, A.; MCCREERY*, R. L. Facile Preparation of Active Glassy Carbon Electrodes with Activated Carbon and Organic Solvents. **Anal. Chem.**, v. 71, n. 16, p. 3574–3580, 1999.
- SUMITA, N. M. et al. **Diretrizes para a Gestão e Garantia da Qualidade de Testes Laboratoriais remotos (TLR) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML)** (W. L. Coutinho, K. G. Inglez, Eds.) Barueri, SPMANOLE, , 2016. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/LivroTLR_2015.pdf>. Acesso em: 17 out. 2017
- SUMMERS, J. The replication cycle of hepatitis B viruses. **Cancer**, v. 61, n. 10, p. 1957–1962, 15 maio 1988.
- SUMMERS, J.; MASON, W. S. Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 638–40, 13 jan. 2004.
- SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5427–34, 14 maio 2014.
- SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: The impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 373–387, 15 jan. 2017.
- TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9–10, p. 865–891, 8 jul. 2014.
- TATEMATSU, K. et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 83, n. 20, p. 10538–10547, 2009.
- TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606–623, 15 dez. 2008.
- THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–31, jan. 2001.
- THIMME, R. et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. **Journal of virology**, v. 77, n. 1, p. 68–76, jan. 2003.
- THUY, P. T. B. et al. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam-genotypes B4 and C1 predominate. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 8, p. 1327–1333, ago. 2010.

TÎLMACIU, C.-M.; MORRIS, M. C. Carbon nanotube biosensors. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. October, p. 1–21, 2015.

TOITA, R. et al. Applications of human hepatitis B virus preS domain in bio- and nanotechnology. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 24, p. 7400–11, 28 jun. 2015.

TORRES-RODRIGUEZ, L. M. et al. Synthesis of a biotin functionalized pyrrole and its electropolymerization: toward a versatile avidin biosensor. **Chemical Communications**, v. 0, n. 18, p. 1993–1994, 1 jan. 1998.

TRAN, T. T. Immune Tolerant Hepatitis B: A Clinical Dilemma. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 8, p. 511–516, 2011.

TRÉPO, C.; CHAN, H. L. Y.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9959, p. 2053–63, 6 dez. 2014.

TROPBERGER, P. et al. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 42, p. E5715-24, 20 out. 2015.

TUNCEL, D. Non-covalent interactions between carbon nanotubes and conjugated polymers. **Nanoscale**, v. 3, n. 9, p. 3545, 1 set. 2011.

TUNCER, C. et al. Synthesis and characterization of water-insoluble statistical copolymer and its application in the development of electrochemical DNA sensor. **Talanta**, v. 100, p. 270–275, out. 2012.

UPE. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Recife, Brasil: [s.n.]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf>. Acesso em: 18 maio. 2017.

URBAN, S. et al. Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 48–64, jul. 2014.

VALENZUELA, P. et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, v. 298, n. 5872, p. 347–50, 22 jul. 1982.

VAN DER LINDEN, W. E.; DIEKER, J. W. Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, n. 1, p. 1–24, 1 set. 1980.

VERNITSKAYA, T. V.; EFIMOV, O. N. Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 66, n. 5, p. 443 – 457, 1997.

VERRIER, E. R.; SCHUSTER, C.; BAUMERT, T. F. Advancing hepatitis B virus entry inhibitors. **Journal of hepatology**, v. 66, n. 4, p. 677–679, abr. 2017.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 520, 20 out. 2014.

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

VILLAR, L. M. et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World journal of virology**, v. 4, n. 4, p. 323–42, 12 nov. 2015.

WAI, C.-T. et al. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 2, p. 192–198, 1 mar. 2005.

WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 7–14, jan. 2005.

WANG, J.; ZHANG, S.; ZHANG, Y. Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(l-lysine) modified glassy carbon electrode. **Analytical biochemistry**, v. 396, n. 2, p. 304–9, 15 jan. 2010.

WANG, L.-X.; LI, X.-G.; YANG, Y.-L. Preparation, properties and applications of polypyrroles. **Reactive & Functional Polymers**, v. 47, p. 125–139, 2001.

WANG, S. et al. Advances in addressing technical challenges of point-of-care diagnostics in resource-limited settings. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 4, p. 449–459, 2 abr. 2016.

WANG, Y. et al. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081, 27 mar. 2008.

WANG, Z.; DAI, Z. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview. **Nanoscale**, v. 7, n. 15, p. 6420–6431, 2015.

WATASHI, K. et al. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1726–1737, maio 2014.

WEEKS, B. S.; ALCAMO, I. E. **Microbes and society**. 2. ed. [s.l.] Jones and Bartlett Publishers, 2008.

WEI, B. Q.; VAJTAI, R.; AJAYAN, P. M. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. **Applied Physics Letters**, v. 79, n. 8, p. 1172–1174, 20 ago. 2001.

WELSHER, K. et al. Selective Probing and Imaging of Cells with Single Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Fluorescent Molecules. **Nano Letters**, v. 8, n. 2, p. 586–590, fev. 2008.

WHO. **Expert Committee on Biological Standardization WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty-ninth report** Geneva World Health Organization, , 2012. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19539en/s19539en.pdf>>. Acesso em: 6 set. 2017

WHO. **Global Health Sector Strategy on viral hepatitis, 2016–2021** Geneva World Health Organization, , 2016a. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf;jsessionid=1EBC3E5CD04475C13B1FA12278A4CD2E?sequence=1>>. Acesso em: 19 jul. 2018

WHO. **Technical considerations and case definitions to improve surveillance for viral hepatitis** Geneva Technical considerations and case definitions to improve surveillance for viral hepatitis, , 2016b. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204501/9789241549547_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 19 jul. 2018

WHO. **Global hepatitis report 2017** WHO Geneva World Health Organization, , 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>>. Acesso em: 7 set. 2017

WILDER, J. W. G. et al. Electronic structure of atomically resolved carbon nanotubes. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 59–62, 1 jan. 1998.

WILLIAMSON, N. R. et al. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylopyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 971–989, 31 mar. 2005.

- WONG, D. T. et al. Historical Path of Discovery of Viral Hepatitis. **Harvard Medical Student Review Issue**, v. 3, p. 1–19, 2015.
- XIA, N. et al. Probing of EDC/NHSS-Mediated Covalent Coupling Reaction by the Immobilization of Electrochemically Active Biomolecules. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 8, p. 2459–2467, 2013.
- XIMENES, R. A. DE A. et al. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 9, p. 1693–1704, set. 2010.
- YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **eLife**, v. 1, p. e00049, 13 nov. 2012.
- YANG, H.-I. et al. Hepatitis B e Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 3, p. 168–174, 18 jul. 2002.
- YANG, N. et al. Carbon nanotube based biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 690–715, 1 fev. 2015.
- YANO, Y.; AZUMA, T.; HAYASHI, Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 3, p. 583–92, 27 mar. 2015.
- YAO, J. et al. Chemistry, physics and biology of graphene-based nanomaterials: new horizons for sensing, imaging and medicine. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 29, p. 14313, 3 jul. 2012.
- YILDIZ, U. H. et al. Recent advances in micro/nanotechnologies for global control of hepatitis B infection. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 178–190, jan. 2015.
- ZAREI, M. Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 494–506, 15 dez. 2017.
- ZHANG, G.-J. et al. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 8, p. 2504–2508, abr. 2009.
- ZHANG, L. L.; ZHOU, R.; ZHAO, X. S. Graphene-based materials as supercapacitor electrodes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 29, p. 5983, 13 jul. 2010.
- ZHANG, R. et al. [Study on the risk factors related vertical transmission of HBV positive couples to their infant]. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 33, n. 12, p. 1283–7, dez. 2012.
- ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2008.
- ZHU, Y. et al. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 35, p. 3906–3924, 15 set. 2010.
- ZHU, Z. An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications. **Nano-Micro Letters**, v. 9, n. 3, p. 1–24, 2017.
- ZORZETTO, R. O mapa das hepatites. **Revista Pesquisa Fapesp**, n. 187, p. 16–21, 2011.
- ZOULIM, F.; LOCARNINI, S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1593–1608.e2, nov. 2009.
- ZOULIM, F.; SEEGER, C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of

the polymerase. **Journal of virology**, v. 68, n. 1, p. 6–13, jan. 1994.

**APÊNDICE A - CAPÍTULO PUBLICADO NO PERIÓDICO
INTECHOPEN**

We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,100

Open access books available

116,000

International authors and editors

120M

Downloads

154

Countries delivered to

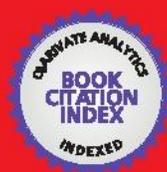
Our authors are among the

TOP 1%

most cited scientists

12.2%

Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index
in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?
Contact book.department@intechopen.com

Numbers displayed above are based on latest data collected.
For more information visit www.intechopen.com



Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor

Blanca A.G. Rodriguez, Erika K.G. Trindade,
Diego G.A. Cabral, Erika C.L. Soares,
Cayo E.L. Menezes, Danielle C.M. Ferreira,
Renata K. Mendes and Rosa F. Dutra

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/61149>

Abstract

Nanotechnology has exerted a significant impact in the development of biosensors allowing more sensible analytical methods. In health applications, the main challenge of the immunoassay is to reach the suitable limit of detection, recognizing different analytes in complex samples like whole blood, serum, urine, and other biological fluids. Different nanomaterials, including metallic, silica and magnetic nanoparticles, quantum dots, carbon nanotubes, and graphene, have been applied, mainly to improve charge electron transfer, catalytic activity, amount of immobilized biomolecules, low-background current, signal-to-noise ratio that consequently increase the sensitivity of immunosensors. Given the great impact of nanotechnology, this chapter intends to discuss new aspects of nanomaterials relating to immunosensor advancement.

Keywords: Immunosensors, immunoassay, nanosensor, nanomaterial

1. Introduction

A major challenge faced by health programs is the maintenance and availability of diagnostic tests that are required not only in inpatient or outpatient hospital but also for an improved epidemiological survey. In many cases, the absence of laboratory testing or delay of diagnosis generates negative economic impacts, resulting in unnecessary hospitalization, intercurrentence,

and in some cases implications on the global life quality of patients and underreporting of surveillance. In this context, the development of practical, fast, and reliable analytical methods is imperative.

Biosensors have been considered one of the more attractive analytical methods. They are biodevices capable of transforming an interaction with specific analytes into an electrical signal by a transducer, including a biorecognition element. [1] Pharmaceutical industries and users of rapid tests from the United States and Europe are unanimous in stating that biosensors, mainly those based on point-of-care testing (POCT), or bedside testings are a practical technology, regarded as a short-, medium-, and long-term trend. Among several advantages, POCT can provide immediate responses (results in few minutes or in real time), samples do not need to be transported to the analytical phase (in situ monitoring) and require generally small volumes of samples, and the users can be skilled or unskilled and present better cost-effective analyses compared with conventional technologies used in clinical diagnostic (user-friendly technology). One of the most widely useful POCT is the glucometer, which measures glucose levels with accuracy by requiring a single drop of blood. The rapid glucose measurement is very important in trials to avoid serious adverse effects stemming from diabetes, including seizures, coma, or even death. Worldwide, some diabetic outpatients have been benefited by POCTs.

Although there is a great promising market dedicated to health for the detection of diseases and therapeutic monitoring, biosensors are not yet entirely broadcast, especially those devoted to nonenzymatic reactions, i.e., biosensors based on the affinity between antigen-antibodies, DNA-RNA, DNA-DNA, etc. So far, there are focused studies to develop affinity biosensors for a wide number of applications. Some of these include environmental, agriculture, veterinary, safety food analysis, and health diagnostic in attempting to detect pesticides in water, in monitoring of environmental pollutants in soil, and in determining contaminants and pathogens in food and many others.[2]

Regarding the health diagnostic, affinity biosensors devoted to immunoserological diagnosis have demonstrated to be more accurate, feasible, practical, and advantageous for POCTs than nucleic acid biosensors. First, the levels of antibodies or antigens circulating in whole blood, serum, or other biological fluids are in higher amounts compared to RNA or DNA sequences. Second, blood samples of immunosensors do not need cell lysis before measurements to release the analytes. Third, antigen or antibody samples do not need pretreatment before measurements as amplification by polymerase chain reaction (PCR) or transcriptase reverse polymerase chain reaction (TR-PCR). Fourth, antibodies are more chemically stable than RNA or DNA sequences that are easily contaminated by attacking the RNases or DNases enzymes present in digital samples.

Due especially to nanotechnology, biosensors dedicated to immunoserological diagnosis have emerged, in the last decade, with the possibility of very promising point-of-care diagnosis. The contribution of nanomaterials has made possible the development of new immobilization matrices with improved features, increased sensor surface area, greater amount of biomolecules per area/volume, and major electrical conductivity, making it possible to achieve a lower limit of detection compared to existing bulk biosensors. Currently, several studies have

highlighted the following nanomaterials: metallic, silica and magnetic nanoparticles, quantum dots (semiconductor nanoparticle), carbon nanotubes, graphene, and nanostructured surface.

Selective monoclonal antibodies, recombinant antigens, fragments, and aptamers associated with the nanomaterial advancements to mediate the antigen-antibody responses have also allowed several nanostructured devices with optical, piezoelectric, and electrochemical improved transductions, besides the integration of microfluidics and portable approaches.

Given the great impact of nanotechnology, this chapter intends to discuss new aspects of nanomaterials concerning to the development of immunosensors that resulted in more accurate, reliable, and practical analytical methods for health.

2. Important aspects for immunosensor development

Immunosensor technology has shown an exponential growth in the number of publications over the last decade (Figure 1(a)). Although, there were significant advances in all the areas mainly in the food analyses, immunosensors devoted to health still have huge challenges to overcome in order to yield commercial uses (Figure 1(b)). Some difficulties can be attributed to the biomolecules specificity, immobilization matrix stability, transduction mode employed and pretreatment of complex samples like whole blood, serum, or other fluidic biologics for a reliable detection.

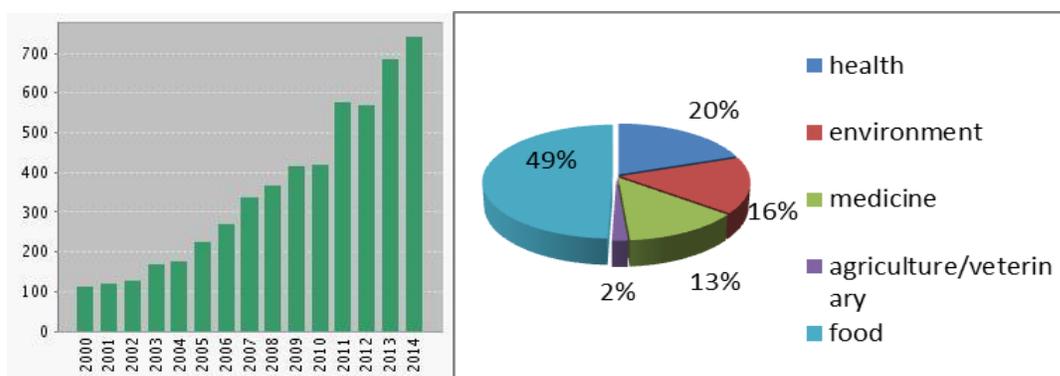


Figure 1. Immunosensors research published over the last decade (a) and main application areas (b). (Extracted from ISI of Knowledge base)

Three aspects are considered crucial in the development of an ideal immunosensor: (a) the bioreceptor, i.e., biomolecule used to recognize the antigen or antibodies in the sample; (b) the matrix assembled for immune compound immobilization; and (c) the transducer type employed.

The choosing of bioreceptors for analyte recognition is a fundamental aspect to ensure an optimal selectivity of immunosensor. Different immunomolecules have been used to detect antigens or antibodies in different samples, besides monoclonal or polyclonal antibodies, and

antigens, recently recombinant antibodies, [3] aptamers, [4] and antibody fragments [5] have been also assayed. Immunoglobulin classes IgG and IgM are the most commonly employed in immunosensors. IgG is a Y-shaped structure with two binding sites for antigens recognizing (two paratopes), with approximately 150 kDa. Meanwhile, IgM immunoglobulins are pentamers comprising of ten antigen sites, called natural antibodies. However, due to IgG being more prevalent and most abundant in the circulation (73%), this immunoglobulin is more frequently used in all immunoassays. IgM immunoglobulins are detected in specific assays when it is important to identify diseases in their acute Phase, Kidwai et al. [6] developed a rapid immunochromatographic (ICT) assay detection for IgM and IgG detection in serum.

Immunosensor performance is directly dependent on the immobilization matrix used and orientation and density of affinity biomolecules (antibodies and antigens) on the electrode surfaces. There are different strategies used to immobilize the recognition element, either directly on the electrode surface or on other solid supports. [7] Conventionally, there are noncovalent and covalent techniques employed to immobilize antibodies, which are based on adsorption, encapsulation, and entrapment in polymers, covalent binding, and cross-linking of antibodies aggregates (Figure 2). Developments in these techniques have great interest and potential application in other areas of biotechnology, including purification of proteins, [8] medicine and drug delivery, [9] regenerative medicine, tissue engineering, and many other applications. [10]

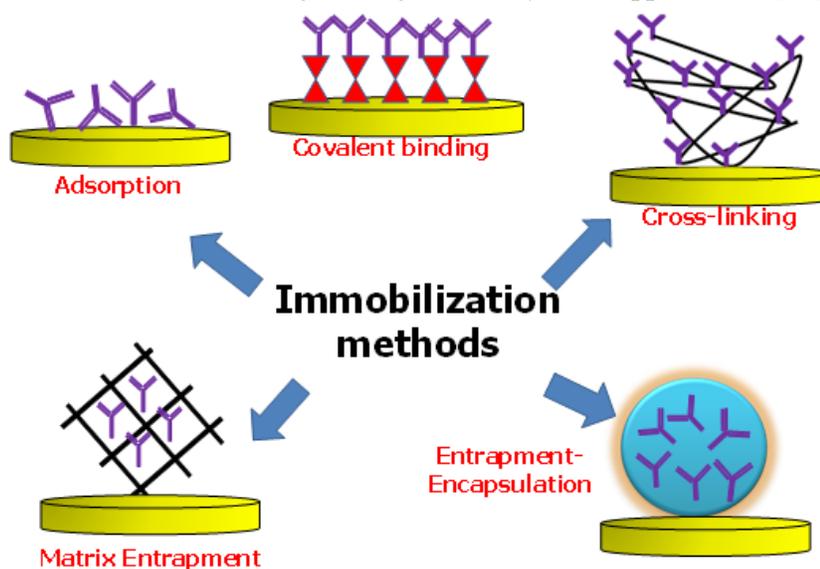


Figure 2. Illustration of different methods of antibodies immobilization.

Although sensor surfaces prepared with antibodies immobilized in a random manner yield satisfactory results, the site-directed immobilization of the sensing molecules significantly improves the immunosensor sensitivity. [11] In this sense, antibodies should be immobilized with optimal capability to recognize the antigens, while fully maintaining their preserved structures. The Fab region needs to be sufficiently free in order to be exposed to the medium, i.e., epitopes of antigens. The best approach is to immobilize antibodies by their Fc regions. [12]

This configuration has been achieved using different strategies, including by the use of protein A [13] or protein G, [14] via covalent immobilization through the oxidized sugar chains of the antibody, [15] and others. Besides orientation, it's important to consider antibody density on the electrode surface. A higher density increases the sensor response, however is likely to increase the steric hindrance on planar substrates causing a low immobilization efficiency and low assay sensitivity. To solve these problems, researchers are focused on modifying the substrates for forming the 3D network, which ensures high percentage availability of antibody binding sites. Nanomaterials contribute to increase the amount of protein immobilization because of their capability to form 3D nanostructured surfaces with innumerable cavities and valleys.

Choosing the transducer is another important and fundamental aspect to achieve the sensitivity and response time desired. Bioaffinity sensors (immunosensor) have been explored by using different transduction modes: optical, acoustic and electrochemical by using different approaches. Surface plasmon resonance, [16] localized surface plasmon resonance [17] and fluorescence resonance energy transfer (FRET) [18] are examples of optical transducers. Quartz crystal microbalance (QCM), also entitled mass-sensitive, is the most explored as acoustic transducer. Electrochemical transducers are comprised of different ways to generate an electrical signal, for instance, by amperometric, impedimetric, potentiometric and capacitive changes. [19] Regarding the response time, two classes of immunosensor operation mode are distinguished by, a) Label-free or nonlabeled immunosensors that readily convert the species interaction response with the complementary species into an electrical signal, denominated as direct transduction, and b) Labeled immunosensors that need a second antibody or antigen conjugated to chemical species to generate the analytical response, such as enzymes, fluorescent labels, etc. [20] Although labeled immunosensors are more time consuming than label-free immunosensors, they provide more specificity due to the second antibody which minimize the nonspecific binding negative effects.

The design of label-free affinity biosensors has been extensively studied in academy and industry. One source of stimulation is the demand of POCTs for health, which requires rapid response, lower cost-effective analyses and simplicity for potential analysis. The main technologies of label-free immunosensors currently in use or under development are: surface plasmon resonance (SPR) devices, mass-sensitive, field effect transistor (FET), and electro-chemical sensors, including impedimetric and capacitive. Recently, due to advances of nanomaterial based-immunosensors, new categories of label-free amperometric sensors using screen printed electrodes have been successfully developed. [21, 22, 23, 24]

3. Immunosensor based on nanomaterials

Nanomaterial is composed of unique functional materials that display incomparable characteristics related to their shape, structure and size (in the order of 1 to 100 nm). Nanostructured materials are interesting because they can bridge the gap between the bulk and molecular

levels and lead to entirely new avenues for applications, especially in electronics, optoelectronics and biology. The contribution of nanomaterials has allowed powerful immunosensor assemblies, creating platforms with increasing detection limit. [25]

In recent years, various nanomaterials with different physical and chemical properties have been applied to achieve the immobilization of immunocompounds. They can modify the sensing surface, improving the immobilization of procedures and transduction properties of immunosensors. A great number of electrochemical advantages have been mentioned, such as possessing low-background current, high signal-to-noise ratio, and fast electron transfer, including an increased amount of immobilized biomolecules, with consequent increase on the sensitivity of sensors. Nanomaterials with zero-dimensional space (metallic, silica, and magnetic nanoparticles and quantum dots or semiconductor nanoparticles), one-dimensional space (carbon nanotubes), and two-dimensional space (graphene) have been shown as potential for different transducers in many immunosensor applications.

3.1. Metallic, silica, and magnetic nanoparticles

Nanoparticles (NPs) obtained from commercial sources or properly produced in laboratories have attracted much attention in biological studies due to their low toxicity, biocompatibility, and unique optical properties. Nanoparticles and nanospheres can be divided into magnetic, metallic, semiconducting, or insulating nanoparticles based on their conductivity.

NPs have high surface areas and unique physical-chemical properties that can be easily tuned, making them ideal candidates for developing immunosensors devices. The basic function of nanoparticles in an immunosensor can be summarized as follows: immobilizing the biomolecules on the electrode surface, catalyzing electrochemical reaction, enhancing electron transfer charge, and acting as a reactant or labeling biomolecules for further experiments, among others. [26]

Biological tests measuring the presence or activity of selected analytes become quicker, more sensitive, and flexible when nanoscale particles are combined, with numerous advantages over more traditional procedures. In recent years, various nanomaterials with distinct physical and chemical properties have been applied to improve the immobilization of immunocompounds. [27] These have many electrochemical advantages, such as possessing low-background current, high signal-to-noise ratio, and fast electron transfer, besides increased amount of immobilized biomolecules, with consequent increase on the sensitivity of sensors. [28]

Surface modification using nanoparticles composites have shown an increase of sensitivity and help adsorb a large amount of antibodies on electrode surface. Lu et al. [29] constructed an immunosensor based on a nanocomposite formed with CeO₂ and gold nanoparticles on the Au electrode via cysteine to detect a cardiac marker, the myeloperoxidase. [29] Thereat, the nanoparticles enhanced the active surface area available for antibody binding. The high stability of this sensor was attributed to the good biocompatibility of the composite. Another study shows an increase in immunosensor response. Fe₂O₃ nanoparticles were used in the construction of an electrochemical device to detect cancer biomarker prostate antigen (PSA) via horseradish peroxidase (HRP) signal. The high amount of nitrodopamine (film coated on nanomaterial to

immobilize the anti-PSA) anchored onto Fe_3O_4 increased the loading of biomolecules onto the surface, which increased the electrochemical immunosensor sensitivity. [30]

The carcinoembryonic antigen (CEA) is a protein used as a tumor marker and has been frequently investigated in immunoreactions. An elevated CEA level in serum may be an early indication of lung cancer, ovarian carcinoma, colon cancer, breast cancer, and cystadenocarcinoma. Recently, an interesting work was reported involving this protein investigation using an immunosensor constructed by Pt hollow nanospheres modified with anti-CEA as label for

a 3D Au-TiO₂ hybrid platform. [31] The immunoassay exhibited a high sensitivity and a low detection limit compared with conventional label methods. Another way to detect CEA antigen was developed by Gao et al. [32] using a label-free voltammetric sensor with chitosan and gold nanoparticles (AuNPs) to immobilize anti-CEA on carbon surface. The detection is based on the variation of current responses before and after the immunoreaction. When the immobilized antibodies have bounded with antigens, the antigen-antibody complex formed on the surface inhibited the electron transfer. Then a decrease of the electrochemical signal was verified as the concentration of antigen on surface increased. Another method also using a composite of chitosan and AuNPs for CEA determination, but with multiwalled carbon nanotubes, was described by Huang et al. [33] The nanocomposite film exhibited high current response intensity, good biocompatibility, and high stability. Similar CEA detection was also performed using a gold nanoparticle-thionine-reduced graphene oxide composite that possesses as advantage fast electron transfer kinetics and large specific surface area. [34] Another work for

CEA analysis described the use of silver nanoparticles on SiO₂ surfaces. [35] The high stability of the immunosensor was assigned to the stable nanocomposite produced.

The sensitivity of electrochemical immunosensors can also be improved by using the association of AuNPs and dendrimers that are three-dimensional macromolecules, with hundreds of functional groups at the periphery, for surface modification. This architecture was employed by An et al. [36] to detect α -synuclein, a very important neuron protein. The dendrimer (PAMAM)-encapsulated AuNPs were covalently bound on the poly-*o*-aminobenzoic acid (ABA) electropolymerized on a glassy carbon electrode surface to achieve abundant carboxyl groups, which allowed a highly dense antigen immobilization and facilitated the improvement of electrochemical responses as well. Subsequently, the enhanced gold nanoparticle labels

were fabricated by immobilizing a horseradish peroxidase secondary antibody (HRP-Ab₂) on the AuNPs surface. After an immunoassay process, the labels were introduced onto the electrode surface to produce an electrocatalytic response with hydrogen peroxide. The presence of dendrimer Au not only increased the covalent coupling of more protein but also accelerated electron transfer when compared to immunosensor without dual signal amplification strategy.

The picogram detection limit of estradiol was achieved using an immunosensor constructed with AuNPs and protein G scaffold to modify a gold electrode. [37] Coupled with the amperometric determination of the hormone in a flow system, the device exhibited superior linear range, sensitivity, and stability in blood serum samples spiked with estradiol.

Other applications for metallic nanoparticle have included optical transduction. Krishnan constructed an optical immunosensor in a quartz glass surface for the detection of *Escherichia*

coli, using core-shell nanoparticles (silver-silica) anchoring labeled antibodies. The results show that changes in photoluminescent standards are consistent with the immobilization of various species. Thus, the optical immunosensor demonstrated improved sensitivity and specificity in comparison to the usual methods, detecting as low as 5 CFU/mL.

Using a great number of luminescence molecules as stabilizers coated on the surface of the AuNPs, Shen et al. [40] developed an electrochemiluminescence immunosensor to detect human cardiac troponin, an important acute myocardial infarction biomarker. First, the sensor was constructed by using streptavidin-coated gold nanoparticles as the immobilization matrix for biotinylated antibody. Meanwhile, the three-dimensional nanostructures increased the surface-to-volume ratio, allowing more biomolecules to be immobilized. The sandwich-type immunosensor was fabricated by reacting with antigen and AuNPs modified with luminescence molecules labeled with the secondary antibody, forming a nanoprobe. The enhanced sensitivity of the proposed apparatus mainly derives from the novel nanoprobe, which achieves a large amount of luminescence molecules loading toward each sandwich immunological reaction event.

Another strategy in immunocomplex detection involves the use of magnetic nanoparticles as solid support for biomolecule immobilization. The magnetic particles offer the convenience of magnetic separation. These particles respond to a magnetic field but demagnetize completely when the field is removed. Thus, the nanoparticles can easily be separated from the liquid phase with a small magnet but can be dispersed again immediately after the magnet is removed. The use of magnetic nanoparticles as solid phase for the immunosensor development improves the bioreaction performance due to surface area increase and has better immunoassay kinetics because the particles are in suspension and the target species does not need to diffuse very far. [41]

An interesting work was described by Shen et al., [42] who developed a device to detect *E. coli*, an intestinal pathogenic bacterium, using a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor based on beacon magnetic nanoparticles. A polyclonal antibody was immobilized on iron nanoparticles with subsequent addition of *E. coli*. AuNPs were inserted in the system to amplify the signal. Weakly bound biomolecules were removed with a magnetic plate. Finally, the crystal was modified with protein A and monoclonal antibody. The frequency shift of the QCM immunosensor is amplified using *E. coli* immobilized on to magnetic particles and enlarged gold particles for the bacterium detection. The signal was amplified three times, and the crystal was regenerated without difficulty and could be used at least 10 times. In a recent work, the use of magnetic nanoparticles as an amplification means for QCM signal for avian influenza H5N1 virus detection has been reported. [43] Polyclonal antibodies against the virus were immobilized on the gold surface of the crystal through self-assembled monolayer (SAM). Target H5N1 viruses were then captured by the immobilized antibodies, resulting in a change in the frequency. Magnetic nanoparticles coated with anti-H5 antibodies were used for further amplification of the binding reaction between antibody and antigen (virus).

AuNPs have a remarkably high extinction coefficient and strong distance-dependent optical properties. Different aggregation states of AuNPs correspond to distinctive color, which can be appreciably discerned with the naked eye and be used in immunoassay. Based on this, Yuan

et al. [44] developed a label-free colorimetric immunoanalysis for the simple detection of neurogenin3, a marker for pancreatic endocrine precursor cells, using glutathione functionalized gold nanoparticles. The antibody-conjugated AuNPs were formed through electrostatic interaction upon the addition of the antibody to the modified AuNPs solution. The antigen positively charged to the negatively charged AuNP antibody will minimize the electrostatic repulsion between nanoparticles by neutralizing the surface charge and then agglomeration is induced by an increasing NaCl salt concentration, noticeably revealed by the color change of the solution from red to purple or blue. The concentration of neurogenin3 can be conveniently accessed by the optical absorption spectra. Another important property of the AuNPs is that they could catalyze silver reduction and act as the nuclei for silver precipitation. [45] In this interesting work, the core mechanism of the method to quantify cardiac troponin is that the catalytic capability of the AuNPs was inhibited by immunocompounds covering their surface. This covering is influenced by the amount of reduced silver of the reaction, resulting in a color difference.

In state-of-the-art improved sensor devices for health applications, the possibility of assembling nanoparticles and biomolecules in different ways by using different sizes, formats, and compound types allow more sensitive, simple, robust, and especially faster analysis.

3.2. Quantum dots

Quantum dots (QDs) represent one class of nanostructured materials. They are spherical nanocrystals of semiconductor, 1-10 nm in diameters, made of elements of the IIB-VIA or IIIA-VA groups. The use of QD properties requires sufficient control during their synthesis because their intrinsic properties are determined by different factors, such as size, shape, defect, impurities, and crystallinity. [46, 47] Two of the most widely used commercial QDs come with a core of CdSe or CdTe and a shell of ZnS and emissions from 405 to 805 nm. [48, 49] The shell stabilizes the structure, helping to overcome quenching compared to a QD made only from a core and provides a large surface area available for further modification.

Analogous dimensions of QD and biological materials, such as enzymes, antigens/antibodies, protein receptors, or nucleic acids, show great promise as photonic labels for bioanalytical applications and suggest that electronic communication between the QD and the specific recognition site or biocatalytic processes of the biomaterials can exist. These electronic interactions may lead to the optical or photoelectrochemical transduction of the biological events. [47, 50]

Generally, monodispersed QDs are developed by introducing organic molecules that adsorb on the surface and act as capping agents. The efficacy of QD in a biological application is critically dependent on coating properties. The liabilities of these initial methods require the continued development of QD coatings. Important criteria for an ideal QD coating include high-affinity for the QD surface, long-term colloidal stability across a broad range of pH and ionic strengths capacity for bioconjugation, minimization of hydrodynamic size, and biocompatibility with nonspecific binding. [51] However, the selection of organic ligands that bond with surface atoms of the QD is a very delicate issue. In general, phosphines or mercaptans (-SH) are the most widely used ligands. [52]

In order to make QD suitable for biological imaging and use in a biological environment, they also have to be rendered water soluble. This is done by capping the shell with a polymer layer that contains a hydrophobic segment facing inward, the shell, and a hydrophilic segment facing outward. The hydrophilic layer can be modified to include functional groups such as -COOH and -NH₂ groups for further conjugation to proteins and antibodies or oligonucleotides. [49, 53] The single-step synthesis of thiolated cyclodextrin-modified CdSe/CdS core-shell QD resulted in a water-soluble QD, keeping the luminescence properties of the QD in aqueous systems. This is an important aspect since biorecognition events require aqueous environments for reaction. [54]

Thiol ligands and amphiphilic polymers are the most common types of QD coating available.

They allow two essential design elements: a moiety that anchors to the QD surface and a hydrophilic functionality for aqueous dispersion. The selection of these groups determines the degree to which a QD coating can approach the ligand/amphiphilic polymer structures. [51] For example, small molecules with thiol groups can bind to the quantum dot surface, and distal carboxylated group provides aqueous colloidal stability. [55] Another strategy for QD coating that provides aqueous dispersion, improves the biocompatibility, and minimizes nonspecific binding was developed by Mattoussi et al. (2000). They combined dihydrolipoic acid, a dithiol ligand that binds the QD more closely, which is attached to a poly(ethylene glycol) oligomer.

Biomolecule conjugation on to the QD is achieved by different ways like electrostatic binding, noncovalent biotin-streptavidin bonding, or covalent bonding. The most widely used conjugation technique of all is the covalent bond formation between the QD surface and the biomolecules. Surface modifications on QD allow easier covalent bond formation. In one of the most widely used methods, amine-terminated QDs are used for conjugating antibodies. The amine-terminated QDs are activated with maleimide containing a cross-linker molecule, which can then be conjugated to a fragment or whole antibody molecule. Some of the most commonly employed QD conjugation methods are based on cross-linking reactions between amine and sulfhydryl groups, carboxylic acid, and amine and aldehyde and hydrazide groups. The carboxylic-amine bond has one advantage over all other methods, seeing as this method does not require any antibody modification before QD conjugation. In the case of amine and sulfhydryl bond formation, the antibody should be reduced to expose their interchain -SH bonds. In relation to aldehyde and hydrazide bonds, carbohydrate groups on the antibody Fc portion are oxidized. These modifications on antibodies may affect their performance to a certain extent. [56]

Functionalized semiconductor quantum dots have been used as fluorescence labels in numerous biorecognition events. For example, Liu et al. (2004) developed an immunosensor with simultaneous measurements of four proteins based on antibodies linked to the inorganic nanocrystal. Stripping voltammetric immunoassay was used to observe the response of a mixture containing microglobulin, IgG, bovine serum albumin, and C-reactive protein connected with ZnS-, CdS-, PbS-, and CuS-labeled antibodies, respectively. The system was obtained by using carbamate linkage for conjugating the hydroxyl-terminated nanocrystal with the secondary antibody. [57]

Li et al. (2011) [58] used a novel strategy to modify the surface of graphene quantum dots composites. A layer-by-layer assembling process was employed via electrostatic interactions

between negatively charged thioglycolic acid modified CdSe QD and positively charged graphene, which was noncovalently functionalized with poly (diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) via an exfoliation in situ reduction of graphene oxide in the presence of PDDA. This process allowed excellent conductivity, extraordinary electron transport properties, and large specific surface area, which resulted in high electroluminescence (ECL) intensity and excellent film-forming ability and made it a promising candidate for the development of ECL immunosensors.

Luminescent quantum dots are viable optical markers and have been used in a direct assay for IgG. Protein A was labeled with CdSe/Zn QD (λ_{max} of 655 nm) and then was immobilized at the tip of an optical fiber. Once the immunoreaction with IgG occurs, a decrease in fluorescence intensity is observed as a result of the fluorescence resonance energy transfer from the QD to the bound protein. [59] Lingerfelt et al. [60] reported the preparation of QD-biotin conjugates and their use in immunochromatographic assays. The detection of immunoglobulin G was carried out on a glass chip through a sandwich assay approach using a secondary antibody conjugated to the QD. [61] A sandwich immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B was run using polyclonal sheep anti-staphylococcal enterotoxin B antibody conjugated with QD and microtiter plates coated with monoclonal staphylococcal enterotoxin B antibody. [62]

Kerman et al. (2007) applied conjugated QD streptavidin in a model immunoassay system for the detection of a total prostate-specific antigen cancer marker from the spiked and undiluted serum samples. Immunorecognition was carried out on a carbon substrate using a sandwich assay approach. After the recognition event, the substrate was exposed to the biotinylated secondary antibodies and, subsequently, fluorescence imaging of the substrate surface illuminated the QD. [63]

QDs based on narrow photoemission spectra, with high resistance to photobleaching and broad excitation spectra, are widely used as tags in immunoassay. A carcinoembryonic antigen immunosensor was fabricated using biofunctionalized QD probes. This immunosensor array was designed to detect a wide range of analytes using the inherent characteristics of QD and the flexibility of engineered elastin-like polypeptides. [64]

There are some studies based on thioalkyl-functionalized QD, which are pH sensitive, [65] suggesting many different biological applications. In this context, mercaptoacetic acid-CdSe/ ZnSe/ZnS QDs have been used as an intracellular pH sensor by observing a quenching of fluorescent QDs in acidic pH. [66]

Another approach was based on the direct conjugation of CdSe/ZnS QD-IgG complexes using a genetically engineered tripartite fusion protein. This fusion protein was made up of a histidine tag for QD conjugation, an elastin-like peptide for stimuli-responsive purification and the protein L (cell-wall component of *Peptostreptococcus magnus*) that has high affinity to IgG. The functionality of this sensitive immunofluorescent probe was demonstrated in the detection of a representative tumor antigen. [64]

Despite recent progress, more work still needs to be done to achieve reproducible and robust surface functionalization and develop flexible bioconjugation techniques. The potential of QD in biology has just begun.

3.3. Carbon nanotubes

Carbon nanotubes (CNTs) can be highlighted as the most important nanomaterials for biosensors. Their excellent optical and mechanical conductivity, high surface-to-volume ratio, good chemical stability, biocompatibility, and easy functionality have revolutionized the biosensors area for the last decade.

Since their discovery by Ijima in 1991, CNTs are being used in large volumes for different purposes in many industrial areas, i.e., in nanocomposites for sporting materials, as a battery in supercapacitors, transparent films, and liquid crystal displays. Other limited-volume carbon applications include their use as components in wind turbine blades, scanning probe tips, membrane filters and sorbents, flat panel displays, memory devices, transistors, drug delivery systems, and other medical and analytical chemistry applications. [67]

Carbon nanotubes can be described as hollow cylindrical tubes of graphene sheets with high aspect ratios (length/diameter). [68] The structure of graphene is a planar atomic sheet consisting of covalently bonded carbon atoms. The atoms in graphene are sp_2 carbon units, forming a two-dimensional (2D) network with a hexagonal lattice. A graphene layer wrapped as a cylinder forms a single-walled carbon nanotube (SWNT). A multiwalled carbon nanotube (MWNT) is nothing more than multiple SWNTs packed in a tight concentric frame. All the carbon nanotubes have several nanometers in diameter and many microns in length. SWNTs have the smallest diameter (0.8-5 nm), whereas MWNTs have a larger diameter (~ 3 to >100 nm), both variable in length (from millimeters to tens of nanometers). The proper architecture is reflected in the highly anisotropic properties. Most of the extraordinary electrical, thermal, and mechanical characteristics are localized specifically along the axial direction. The strong sp_2 bonding between the carbon atoms in CNTs yields remarkable mechanical strength, making them one of the most resilient materials. Moreover, it is known that an SWNT presents metallic and semiconducting properties where such electronic features depend on its chirality. [69] They have three different structures: armchair, zigzag, and chiral. [70]

The applications of CNTs in biosensors have been hindered for a long time due to the drawback of insolubility. CNTs present a high molecular weight, an ability to entangle (tendency to individually interact with each other through van der Waals forces), aggregating into bundles and ropes. However, these bundles can be quite large that they become insoluble in any solvent; thereby, it can be difficult to disperse them in either aqueous or nonaqueous medium. [71]

Ultrasonication is an effective method to disperse CNTs in liquids that have low viscosity, such as water, acetone, and ethanol. However, most polymers are either in a solid or viscous liquid state, which require the polymer to be dissolved or diluted using a solvent to reduce the viscosity before dispersion of CNTs. [72] The simplest stable dispersions have been achieved by using a solvent able to efficiently interact with CNTs, such as phenylethyl alcohol, *N*-methylpyrrolidone (NMP), *N,N*-dimethylformamide (DMF), and *N,N*-diethylacetamide (DEA). An additional strategy to favor dispersion in organic solvents is to coat CNTs with a molecule characterized by a high affinity toward nanotube sidewalls and at the same time soluble in the selected solvent. Both small molecules and polymers formed by repetitive units

of alkyl chains and aromatic compounds have been used as dispersants. Thus, the adsorption of different polycyclic aromatic hydrocarbons such as pyrene, anthracene, tetracene, and phenanthrene on SWCNTs has been extensively investigated. In order to favor the dispersion of CNTs in water, the widely and most used approach is the adsorption of surfactants. These small molecules typically have a hydrophobic tail and a hydrophilic head group—the former is intended to favor adsorption onto the hydrophobic carbon nanotube and the latter to promote affinity with the aqueous solvent. Over the years, stable aqueous CNT dispersions were obtained with differently charged and nonionic surfactants such as sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS), cetyltrimethylammonium p-toluenesulfonate (CTAT), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and sodium cholate (SC) enhanced by sonication. Additionally, polymers have been employed for CNT dispersion in water. The majority of polymers and block copolymers have been used to wrap CNT by exposing their polar domains toward the aqueous environments while favoring the contact of their hydrophobic domains with the nanotube surface. [73]

Strategies for the immobilization of biomolecules on CNTs have been widely explored aiming to improve sensitivity on an immunosensor. The high aspect-ratio of CNT allows a great amount of anchored biomolecules by noncovalent and covalent functionalization for different types of transduction (Figure 3).

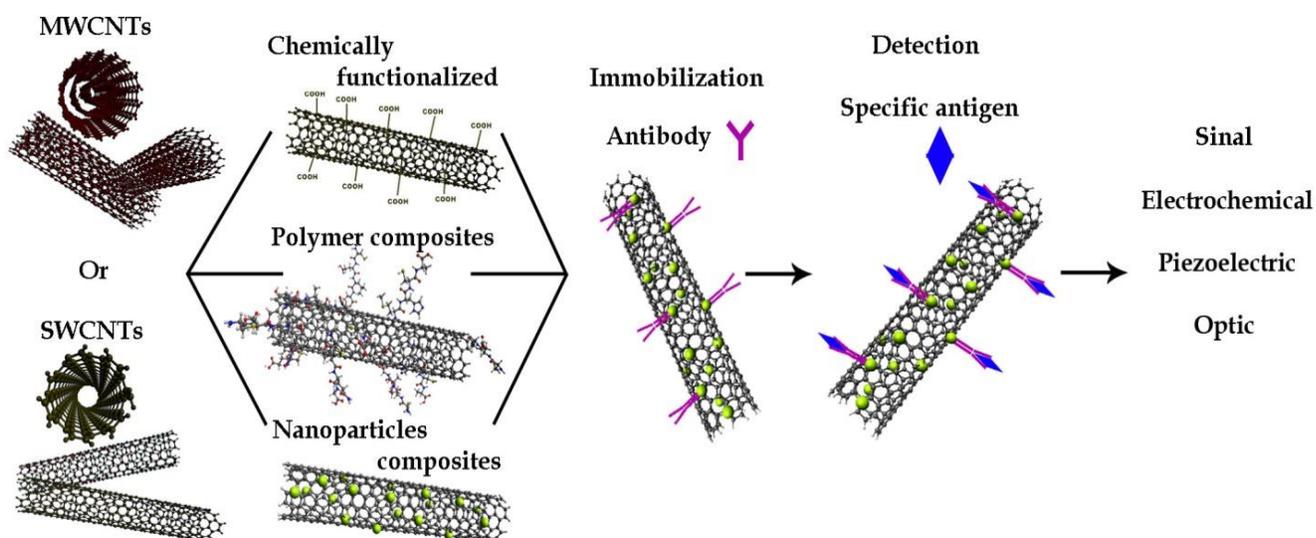


Figure 3. The schematic diagram steps and transducer types of immunosensors based on carbon nanotubes.

Noncovalent functionalization enables reversible adsorption of biomolecules on the CNT surface. For this purpose, CNTs are added to a dispersant solution, and the mixture is agitated in an ultrasound bath. The CNTs are mechanically debundled and then stabilized by dispersant molecules through noncovalent interactions. This does not cause changes in the chemical structures, electronic, and mechanical properties of the carbon nanotubes, and therefore it is a very attractive method. Surfactants, biomolecules, and polymers are widely used as dispersants and noncovalent modifiers. Among them, the polymers are quite efficient dispersants because of their long chain structure that can wrap themselves around CNTs by disrupting the van der Waals interactions between the walls of nanotubes. In biosensors, polymers are

particularly interesting and have been widely employed to prepare CNT composites for electrochemical detection, especially for conductive polymers due to their native electron transmediation, high conductivity, good environmental stability, and specific organic groups. Furthermore, they can be overoxidized to create an electrically insulating layer. Many reports have demonstrated that CNTs coated with polymers, including polypyrrole, poly(methylene blue), poly(neutral red), poly(acrylic acid), and poly(3-methylthiophene) have become a popular strategy [74]

The covalent chemical functionalization arises mainly from organic molecules reacting with carboxyl groups of CNTs treated by oxidation, which depends on the hydrophilicity/hydrophobicity of the species attached, which can make carbon nanotubes soluble in water or organic solvents. The modification of carbon nanotube surfaces by covalent attachments of soluble groups usually alters intrinsic properties such as conductivity, mechanical strength, and optical properties. [73, 75] Nevertheless, the functionalization involving the introduction of carboxyl, amine, thiol, and other reactive groups are attractive strategies because antibodies or antigens can be covalently immobilized, improving the stability and, in some cases, the sensitivity and selectivity of the immunosensors. Figure 4 exhibits different covalent and noncovalent methods of functionalization of the carbon nanotubes.

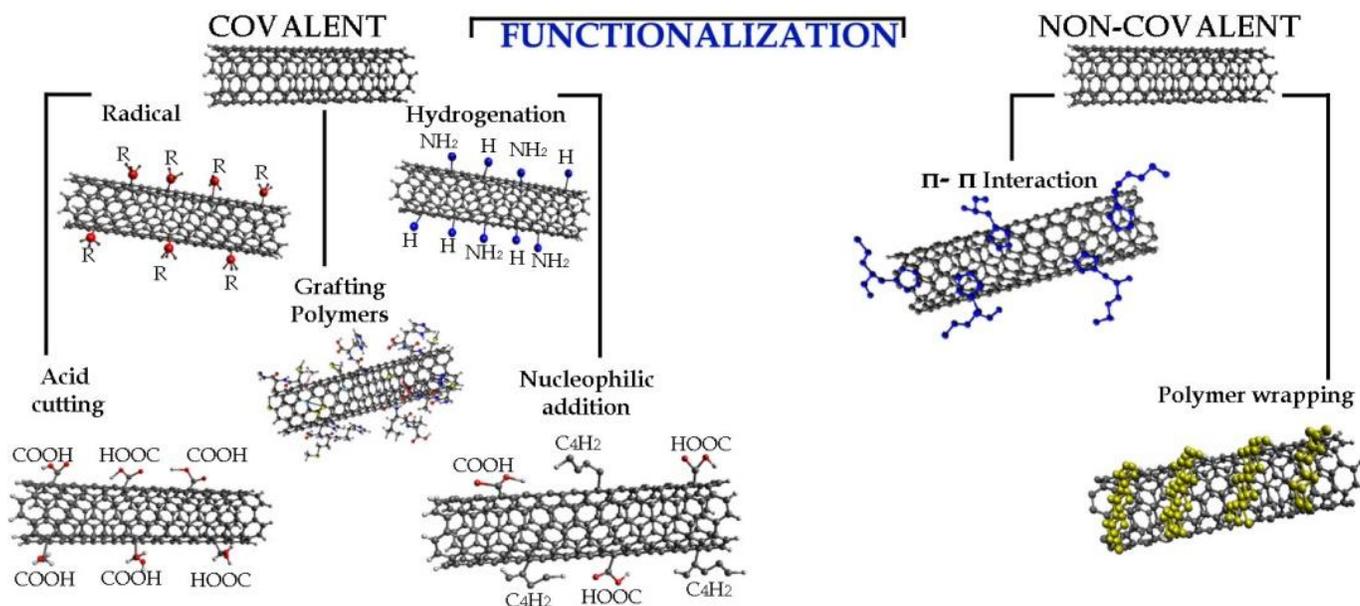


Figure 4. Illustration of different carbon nanotube functionalization methods.

In some practical applications, Sánchez and coworkers [76] have constructed immunosensors where the biomolecules are immobilized on an MWCNT-polysulfone composite film. The layer was applied onto screen printed working electrodes to provide a suitable immunosensor for the rapid determination of human chorionic gonadotropin hormone. The detection limit was 14.6 mIU/mL with a linear range up to 600 mIU/mL. Viswanathan et al. [77] developed another disposable electrochemical immunosensor based on CNTs for the detection of carcinoembryonic antigen with a detection limit of 1 pg/mL in saliva and serum.

For better detecting performance toward interleukin-6, in cases of oral cancer, Malhotra et al. [78] made an ultrasensitive immunosensor sandwich assay on an electrically conductive and

high surface area platform, featuring densely packed and upright SWCNTs with capture antibodies attached to their ends. This biosensor had the highest sensitivity at $19.3 \text{ nA/mL (pg IL-6)}_{-1} \text{ cm}_{-2}$ and the best detection limit (DL) of $0.5 \text{ pg/mL (25 fM)}$ for IL-6 in $10 \text{ }\mu\text{L}$ of calf serum. Similarly, Munge et al. [79] have presented a novel electrochemical sensor using a sandwich immunoassay for the detection of metalloproteinase-3, a cancer biomarker, based on vertically aligned SWCNT arrays. The multilabeled polymeric bead amplification method demonstrated a detection limit of 0.4 ng/mL in $10 \text{ }\mu\text{L}$ of calf serum. This showed great potential for these elements in future cancer diagnostics.

The self-assembly of oxidative SWCNTs on gold was attempted for the detection of bovine serum albumin, BSA, by cyclic voltammetry. This sensor has shown excellent sensitivity and dynamic linear response at the range of 0.1 to $1.2 \text{ }\mu\text{M}$. [80] A conductive multilayer composed of Nafion-coated MWCNTs, thionine (Thi), and AuNPs was prepared using an innovative self-assembly strategy to form an immunosensor for α -1-fetoprotein. This reagentless amperometric sensor presented broader linear response in two ranges between 0.5 - 20 ng/mL and 20 - 200 ng/mL with a detection limit of 0.26 ng/mL . [81]

There are many studies demonstrating that CNTs can provide high electrocatalytic activity to the electrochemical devices and minimize surface fouling effect. Their unique properties enable them to promote a fast electron transfer, play the role of a biomolecular immobilization platform, and be compatible with different materials for construction of different electrodes. The sensitivity of electrochemical sensors has been greatly enhanced due to these materials, which promotes high active surface area and conductivity. CNTs play an important role in recent trends for immunosensor fabrication. They can function as transducers, act as carriers and labels of immunoassay due to the transfer of large amounts of electroactive species for amplifying electrochemical signals, and also offer an easy way to protect and stabilize these bioactive species. [82] In this section, different strategies were described like the easy adsorption of CNT on the electrode surface, biomolecule immobilization by simple adsorptions and covalent binding, and preparation of screen printed electrode.

Based on a simple amino-functionalization method for MWCNT, Dutra's group developed an electrochemical immunosensor for the detection of human cardiac troponin T (cTnT), an important marker for acute myocardial infarction. It showed a broad linear range (0.02 to 0.32 ng/mL) and a low limit of detection, 0.016 ng/mL . [83] Another sandwich-type immunosensor for the detection of cTnT based on carbon nanotubes supported by a conductive polyethyleneimine film has achieved a low limit of the detection of 0.033 ng/mL and a linear range between 0.1 and 10 ng/mL . [24] Amperometric response is generated by peroxidase reaction with substrate in chronoamperometry detection. The high electronic transfer and catalytic response helped by the CNT was essentially important to dispense the mediator in order to generate the analytical responses. Due to the high conductivity achieved by incorporation of CNTs in screen printed electrodes, a label-free amperometric immunosensor was fabricated, presenting new strategies based on differential pulse amperometry. The immunosensing device for cTnT, with amine-functionalized carbon nanotubes incorporated in screen-printed

electrode ink, reached a lower detection limit of 0.0035 ng/ml, better than any previously described immunologic sensors. [21]

3.4. Graphene

Graphene is a two-dimensional material, formed by carbon atoms that are densely packed in a regular sp_2 -bonded atomic scale as a hexagonal pattern, [84] which was produced in laboratory for the first time in 2004. [85] This is the base construction block for other carbon allotropes such as fullerene, carbon nanotubes, graphite, nanoribbons, and others. [86] It is a transparent (optical transmittance of $\sim 97.7\%$), very thin sheet with large theoretical surface area ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), one atom thick, stronger than steel (mechanical stiffness of 1TPa). In addition, it is a good heat conductor (thermal conductivity of $500 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), chemically inert, and a semimetal with high electron transfer (charge-carrier mobility of $250\,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at room temperature). [87, 88] These properties make them attractive for many applications. [84] There are a variety of synthesis methods for obtaining graphene such as chemical vapor deposition, chemical vapor deposition by plasma, the graphite intercalation of metal sheets, mechanical or thermal exfoliation of graphite oxide, intercalation, and exfoliation of graphite, among other variants of these. Despite all these syntheses methods, the mass production is still difficult, making it hard to develop some applications. [88]

Graphene oxide (GO) synthesis has been an alternative to graphene mass production. It is produced from the oxidation of graphite and has polar oxygen functional groups. GO is rich in carboxylic acids at its edges, and epoxy and hydroxyl groups at basal planes, which grants many functionalization routes and good dispersion in water. [89] Furthermore, the functional groups are responsible for the exfoliation of graphite, seeing as they increase the interplanar distance due to the formation of hydrogen bonds between the graphite sheets. The hydrogen bonds are weak and can be easily broken by ultrasound bath, resulting in monolayer or a few sheets of carbon, known as GO. This is an excellent material for biological applications attributed to the functional groups that readily interact with nucleic acids, proteins, cells, and other organic molecules. However, GO is not a good electrical conductor because of the disruption of its sp_2 bonding as functional groups increase, which can narrow its nanobio-technology applications. To overcome these difficulties, the reduced form of GO has been chosen as an alternative.

Reduced graphene oxide (RGO) has more commonly been used to form nanocomposites with nanoparticles or polymers to develop biomedical applications such as biosensors, controlled drug delivery, therapeutic modalities for cancer treatment, substrates for antibacterial effects, scaffolds for mammalian cell culture, and gene delivery among others. [90]

In the RGO synthesis, functional groups are removed, and the conductivity is increased again. This removal can be done in different ways such as electrochemical, optical, hydrothermal, microwave, or heating procedures. These methods for removing the functional groups form different shapes and therefore the conductivity recovery is variable. Also, they form different functional groups, becoming favorable in a wide number of applications. [91]

The most common method for obtaining RGO is chemical reduction, which is used in colloidal dispersing of GO. Hydrazine monohydrate is the most used reduction agent, seeing as it does not react with water, which makes it attractive for aqueous dispersions. The reduction process mediated by hydrazine normally occurs through the addition of H₂ groups and removal of N₂, and it is gentle enough not to affect the cyano and nitro groups. The second most used reducing agent is sodium borohydride (NaBH₄), which is more effective than hydrazine and easily hydrolyzed in water. The hydrolysis process should be slow enough so it does not affect the reduction process. The NaBH₄ reduces C=O species and has a low effect in epoxy and carboxylic acid groups. Other reduction agents such as hydroquinone, alkaline solutions, and gaseous hydrogen are also being described as mediators. [92]

Another low-cost mean of producing RGO is by thermally reducing GO, heating it in a furnace at 1050 °C, which creates thermodynamically stable oxide carbon species. Electrochemistry can also be used in the reduction process of GO, removing oxygen functionalities. Thermal and electrochemical reduction techniques have the advantage of avoiding dangerous reducers and the problem with their disposal, but they are still less used than chemical reduction. The reduction processes frequently provide RGO with functional groups, but in some cases, its functionalization is still necessary prior to use. Covalent and noncovalent methods for functionalization of RGO have been studied, whereas noncovalent bonds are the most common used, for instance, the physical adsorption of both polymers and small molecules via van der Waals interactions onto the basal planes of RGO sheets. [92]

An initial and successful approach using RGO to create biosensors was its combination with nanoparticles. An example is the work of Shan et al., [93] who used Au nanoparticles associated with RGO and chitosan as a nanocomposite film onto a gold electrode for developing an electrochemical glucose sensor obtaining a linear response range from 2 to 10 mM. Copper nanoparticles were also used to modify RGO sheets to create an electrochemical sensor for glucose obtaining a detection limit of 0.5 μM. [94]

Afterward, RGO was applied to the production of immunosensors, with and without nanoparticles. An example is the work of Mao et al., [95] who reported the use of RGO sheets coated with Au nanoparticles, which were initially functionalized with human immunoglobulin G (IgG) to create conjugates. These conjugates were immobilized onto a field effect transistors (FETs) biosensor platform for the detection of human proteins.

A developing area for immunosensors is the detection of cancer markers. It is a recent and very attractive field, with growing publication numbers, including the use of RGO for these. An example is the work of Zhong et al., [96] who used a gold nanoparticle enwrapped graphene nanocomposite on a glassy carbon electrode in a sandwich-type immunoassay format. The detection limit obtained for this assay was 10.0 pg mL⁻¹. Another CEA immunosensor was developed by Huang et al. [97] using Ag/Au nanoparticles coated with RGO in a clinical immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen (CEA). The nanoparticles were used as means for amplification of the signal and the method showed a detection limit of 8.0pg mL⁻¹ in human serum.

Different cancer markers were the focus of other works, such as the one developed by Tang et al., [98] which aimed to create an electrochemical immunosensor for the simultaneous detection of alpha fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA), using biofunction- alized magnetic RGO nanosheets (MGO) coated with iron oxide nanoparticles as immuno- sensing probes, obtaining detection limits of 1 pg mL^{-1} for CEA and 1 pg mL^{-1} for AFP. Also, Teixeira et al. [99] created a chemically modified epitaxial graphene diagnostic sensor for the detection of human chorionic gonadotropin, which is a main marker for pregnancy and can also indicate some types of tumors. They obtained a detection limit of 0.62 ng/mL .

For optical transducers in cancer marker detection, RGO was used by Xu et al. [100] in a modified glassy carbon electrode using luminol to create a electrogenerated chemilumines- cence (ECL) immunosensor for prostate specific antigen, using two antibodies in a sandwich immunoassay, which achieved a detection limit 8.0 pg mL^{-1} . RGO was also used in the development of an ECL immunosensor using CdTe quantum dots (semiconductor nanocrys- tals) along with Au nanoparticles for signal amplification in the detection of human IgG with detection limit of 0.005 pg/mL . [101]

4. Conclusions

The different concepts of nanomaterials applied to immunosensors have been discussed. Nanomaterials can be utilized for a wide variety of immobilization matrices intending to improve the immunosensor sensitivity, allowing lower limit of detection. The potential of nanomaterials on immunosensors has resulted in a positive impact on the clinical outcome of various diseases, including cancer, cardiac injuries, parasitic infections, and viruses, among others. It is well known that carbon nanotubes and graphene nanostructures are more favorable to amperometric transducers due to their electrochemical proprieties, which increase the electronic transfer charge and electrocatalytic activity. Metallic and magnetic nanoparticles have successfully been applied to different transducers, especially electrochemical, by enlarging the electroactive surface area. Quantum dots, a semiconductor nanoparticle, present a promising potential for many transducers mainly due to their photostability and lumines- cence characteristics. Nevertheless, more challenging studies involving nanomaterial sciences, biochemistry, electronic, and molecular engineering should be done in attempting to achieve faster, more practical, and more reliable biosensors. More specifically, biomolecules and a deeper knowledge in nanomaterial science associated to new electronic designs represent a promising field in the development of portable and integrated point of care devices for health applications and other areas of diagnostic.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of the National Council for Scientific and Technolog- ical Development (CNPq), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel), and the Foundation for Research of the State of Pernambuco (FACEPE).

Author details

Blanca A.G. Rodriguez₁, Erika K.G. Trindade₁, Diego G.A. Cabral₁, Erika C.L. Soares₁, Cayo E.L. Menezes₁, Danielle C.M. Ferreira₂, Renata K. Mendes₃ and Rosa F. Dutra₁*

*Address all correspondence to: rosa.dutra@ufpe.br

1 Laboratory of Biomedical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

2 National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

3 Pontifical Catholic University of Campinas, São Paulo, Brazil

References

- [1] Morgan, C.; Newman, D.; Price, C., Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry* 1996, 42 (2), 193-209.
- [2] Holford, T. R. J.; Davis, F.; Higson, S. P. J., Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2012, 34 (1), 12-24.
- [3] Zeng, X. Q.; Shen, Z. H.; Mernaugh, R., Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 402 (10), 3027-3038.
- [4] Lim, Y. C.; Kouzani, A. Z.; Duan, W., Aptasensors: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2010, 6 (2), 93-105.
- [5] Rousseaux, J.; Rousseaux-Prevost, R.; Bazin, H., Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab)₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Journal of Immunological Methods* 1983, 64, 141-146.
- [6] Kidwai, A. A.; Jamal, Q.; Mehruddin, S.; Farooqi, F. U. R.; Saleem, U., Serodiagnosis of dengue infection using rapid immunochromatography test in patients with probable dengue infection. *Journal of the Pakistan Medical Association* 2010, 60 (11), 936-939.
- [7] Pei, X.; Zhang, B.; Tang, J.; Liu, B.; Lai, W.; Tang, D., Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: a review. *Analytica Chimica Acta* 2013, 758, 1-18.
- [8] Pfaunmiller, E.; Moser, A. C.; Hage, D. S., Biointeraction analysis of immobilized antibodies and related agents by high-performance immunoaffinity chromatography. *Methods* 2012, 56 (2), 130-135.
- [9] Sanchez-Moreno, P.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Boulaiz, H.; Marchal, J. A.; Peula-Garcia, J. M., Synthesis and characterization of lipid immuno-nanocapsules for directed drug

- delivery: selective antitumor activity against HER2 positive breast-cancer cells. *Biomacromolecules* 2013, 14 (12), 4248-4259.
- [10] Shalumon, K. T.; Chen, J. P., Scaffold-based drug delivery for cartilage tissue regeneration. *Current Pharmaceutical Design* 2015.
- [11] Makaraviciute, A.; Ramanaviciene, A., Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2013, 50, 460-471.
- [12] Bergstrom, G.; Mandenius, C.-F., Orientation and capturing of antibody affinity ligands: applications to surface plasmon resonance biochips. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2011, 158 (1), 265-270.
- [13] Cavalcanti, I. T.; Silva, B. V. M.; Peres, N. G.; Moura, P.; Sotomayor, M. D. P. T.; Guedes, M. I. F.; Dutra, R. F., A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. *Talanta* 2012, 91, 41-46.
- [14] Lee, J.; Park, H.; Jung, Y.; Kim, J.; Jung, S.; Chung, B., Direct immobilization of protein G variants with various numbers of cysteine residues on a gold surface. *Analytical Chemistry* 2007, 79 (7), 2680-2687.
- [15] Batalla, P.; Fuentes, M.; Grazu, V.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Oriented covalent immobilization of antibodies on physically inert and hydrophilic support surfaces through their glycosidic chains. *Biomacromolecules* 2008, 9 (2), 719-723.
- [16] Dutra, R. F.; Kubota, L. T., An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. *Clin Chim Acta* 2007, 376 (1-2), 114-120.
- [17] Lee, J. H.; Kim, B. C.; Oh, B. K.; Choi, J. W., Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1. *Nanomedicine* 2013, 9 (7), 1018-1026.
- [18] Grant, S. A.; Pierce, M. E.; Lichlyter, D. J.; Grant, D. A., Effects of immobilization on a FRET immunosensor for the detection of myocardial infarction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, 381 (5), 1012-1028.
- [19] Mehrvar, M.; Abdi, M., Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences* 2004, 20 (8), 1113-1126.
- [20] Mistry, K. K.; Layek, K.; Mahapatra, A.; RoyChaudhuri, C.; Saha, H., A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. *Analyst* 2014, 139 (10), 2289-2311.
- [21] Silva, B.; Cavalcanti, I.; Silva, M.; Dutra, R., A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. *Talanta* 2013, 117, 431-437.

- [22] Qi, T.; Liao, J.; Li, Y.; Peng, J.; Li, W.; Chu, B.; Li, H.; Wei, Y.; Qian, Z., Label-free alpha fetoprotein immunosensor established by the facile synthesis of a palladium-graphene nanocomposite. *Biosens Bioelectron* 2014, 61, 245-250.
- [23] Pandiaraj, M.; Sethy, N. K.; Bhargava, K.; Kameswararao, V.; Karunakaran, C., Designing label-free electrochemical immunosensors for cytochrome c using nanocomposites functionalized screen printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 2014, 54, 115-121.
- [24] Gomes-Filho, S. L. R.; Dias, A. C. M. S.; Silva, M. M. S.; Silva, B. V. M.; Dutra, R. F., A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. *Micro-chemical Journal* 2013, 109, 10-15.
- [25] Dolatabadi, J.; de la Guardia, M., Nanomaterial-based electrochemical immunosensors as advanced diagnostic tools. *Analytical Methods* 2014, 6 (12), 3891-3900.
- [26] Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A. J.; Smyth, M. R., Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. 2006; 319-326.
- [27] Vidotti, M.; Carvalhal, R. F.; Mendes, R. K.; Ferreira, D. C. M.; Kubota, L. T., Biosensors based on gold nanostructures. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011, 22 (1), 3-20.
- [28] Campbell, F.; Compton, R., The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 396 (1), 241-259.
- [29] Lu, L.; Liu, B.; Li, S.; Zhang, W.; Xie, G., Improved electrochemical immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on nanogold/cerium dioxide-BMIMPF₆/L-Cysteine composite film. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, 86 (2), 339-344.
- [30] Li, H.; Wei, Q.; Wang, G.; Yang, M.; Qu, F.; Qian, Z., Sensitive electrochemical immunosensor for cancer biomarker with signal enhancement based on nitrodopamine-functionalized iron oxide nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, 26 (6), 3044-3049.
- [31] Yang, H.; Yuan, R.; Chai, Y.; Mao, L.; Su, H.; Jiang, W.; Liang, M., Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification. *Biochemical Engineering Journal* 2011, 56 (3), 116-124.
- [32] Gao, X.; Zhang, Y.; Wu, Q.; Chen, H.; Chen, Z.; Lin, X., One step electrochemically deposited nanocomposite film of chitosan-carbon nanotubes-gold nanoparticles for carcinoembryonic antigen immunosensor application. *Talanta* 2011, 85 (4), 1980-1985.
- [33] Huang, K.; Niu, D.; Xie, W.; Wang, W., A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-Au/multi-walled carbon nanotubes-chitosan nanocomposite film modified glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* 2010, 659 (1-2), 102-108.

- [34] Kong, F.; Xu, M.; Xu, J.; Chen, H., A novel label-free electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on gold nanoparticles-thionine-reduced graphene oxide nanocomposite film modified glassy carbon electrode. *Talanta* 2011, 85 (5), 2620- 2625.
- [35] Yuan, Y.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhuo, Y.; Mao, L.; Yuan, S., A novel label-free electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on the [Ag-Ag₂O]/SiO₂ nanocomposite material as a redox probe. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2010, 643 (1-2), 15-19.
- [36] An, Y.; Jiang, X.; Bi, W.; Chen, H.; Jin, L.; Zhang, S.; Wang, C.; Zhang, W., Sensitive electrochemical immunosensor for alpha-synuclein based on dual signal amplification using PAMAM dendrimer-encapsulated Au and enhanced gold nanoparticle labels. *Biosensors and Bioelectronics* 2012, 32 (1), 224-230.
- [37] Liu, X.; Wong, D., Picogram-detection of estradiol at an electrochemical immunosensor with a gold nanoparticle vertical bar protein G-(LC-SPDP)-scaffold. *Talanta* 2009, 77 (4), 1437-1443.
- [38] Krishnan, S.; Chinnasamy, T.; Veerappan, S.; Senthilkumar, K.; Kannaiyan, D., Dual labeled Ag@SiO₂ core-shell nanoparticle based optical immunosensor for sensitive detection of *E. coli*. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* 2014, 45, 337-342.
- [39] Zhang, S.; Ma, H.; Yan, L.; Cao, W.; Yan, T.; Wei, Q.; Du, B., Copper-doped titanium dioxide nanoparticles as dual-functional labels for fabrication of electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2014, 59, 335-341.
- [40] Shen, W.; Tian, D.; Cui, H.; Yang, D.; Bian, Z., Nanoparticle-based electrochemiluminescence immunosensor with enhanced sensitivity for cardiac troponin I using *N*-(aminobutyl)-*N*-(ethylisoluminol)-functionalized gold nanoparticles as labels. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 27 (1), 18-24.
- [41] Mendes, R.; Laschi, S.; Stach-Machado, D.; Kubota, L.; Marrazza, G., A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2012, 166, 135-140.
- [42] Shen, Z.; Wang, J.; Qiu, Z.; Jin, M.; Wang, X.; Chen, Z.; Li, J.; Cao, F., QCM immunosensor detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26 (7), 3376-3381.
- [43] Li, D.; Wang, J.; Wang, R.; Li, Y.; Abi-Ghanem, D.; Berghman, L.; Hargis, B.; Lu, H., A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26 (10), 4146-4154.
- [44] Yuan, Y.; Zhang, J.; Zhang, H.; Yang, X., Label-free colorimetric immunoassay for the simple and sensitive detection of neurogenin3 using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26 (10), 4245-4248.

- [45] Wu, W.; Bian, Z.; Wang, W.; Zhu, J., PDMS gold nanoparticle composite film-based silver enhanced colorimetric detection of cardiac troponin I. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2010, 147 (1), 298-303.
- [46] Bera, D.; Qian, L.; Tseng, T.; Holloway, P., Quantum dots and their multimodal applications: a review. *Materials* 2010, 3 (4), 2260-2345.
- [47] Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I., Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* 2008, 47 (40), 7602-7625.
- [48] Medintz, I.; Uyeda, H.; Goldman, E.; Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials* 2005, 4 (6), 435-446.
- [49] Chan, W.; Nie, S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998, 281 (5385), 2016-2018.
- [50] Somers, R.; Bawendi, M.; Nocera, D., CdSe nanocrystal based chem-/bio-sensors. *Chemical Society Reviews* 2007, 36 (4), 579-591.
- [51] Algar, W.; Susumu, K.; Delehanty, J.; Medintz, I., Semiconductor quantum dots in bioanalysis: crossing the valley of death. *Analytical Chemistry* 2011, 83 (23), 8826-8837.
- [52] Colvin, V.; Goldstein, A.; Alivisatos, A., Semiconductor nanocrystals covalently bound to metal-surfaces with self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114 (13), 5221-5230.
- [53] Lidke, D.; Nagy, P.; Heintzmann, R.; Arndt-Jovin, D.; Post, J.; Grecco, H.; Jares-Erijman, E.; Jovin, T., Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nature Biotechnology* 2004, 22 (2), 198-203.
- [54] Palaniappan, K.; Xue, C.; Arumugam, G.; Hackney, S.; Liu, J., Water-soluble, cyclodextrin-modified CdSe-CdS core-shell structured quantum dots. *Chemistry of Materials* 2006, 18 (5), 1275-1280.
- [55] Mattoussi, H.; Mauro, J.; Goldman, E.; Anderson, G.; Sundar, V.; Mikulec, F.; Bawendi, M., Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society* 2000, 122 (49), 12142-12150.
- [56] Xing, Y.; Chaudry, Q.; Shen, C.; Kong, K.; Zhau, H.; Chung, L.; Petros, J.; O'Regan, R.; Yezhelyev, M.; Simons, J.; Wang, M.; Nie, S., Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature Protocols* 2007, 2 (5), 1152-1165.
- [57] Liu, G.; Wang, J.; Kim, J.; Jan, M.; Collins, G., Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins. *Analytical Chemistry* 2004, 76 (23), 7126-7130.
- [58] Li, L.; Liu, K.; Yang, G.; Wang, C.; Zhang, J.; Zhu, J., Fabrication of graphene-quantum dots composites for sensitive electrogenerated chemiluminescence immunosensing. *Advanced Functional Materials* 2011, 21 (5), 869-878.

- [59] Aoyagi, S.; Kudo, M., Observation of fluorescence-labeled protein A on a biosensor surface by means of TOF-SIMS. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2005, 108 (1-2), 708- 712.
- [60] Lingerfelt, B.; Mattoussi, H.; Goldman, E.; Mauro, J.; Anderson, G., Preparation of quantum dot-biotin conjugates and their use in immunochromatography assays. *Analytical Chemistry* 2003, 75 (16), 4043-4049.
- [61] Sun, B.; Xie, W.; Yi, G.; Chen, D.; Zhou, Y.; Cheng, J., Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection. *Journal of Immunological Methods* 2001, 249 (1-2), 85-89.
- [62] Goldman, E.; Balighian, E.; Mattoussi, H.; Kuno, M.; Mauro, J.; Tran, P.; Anderson, G., Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *Journal of the American Chemical Society* 2002, 124 (22), 6378-6382.
- [63] Kerman, K.; Endo, T.; Tsukamoto, M.; Chikae, M.; Takamura, Y.; Tamiya, E., Quantum dot-based immunosensor for the detection of prostate-specific antigen using fluorescence microscopy. *Talanta* 2007, 71 (4), 1494-1499.
- [64] Lao, U.; Mulchandani, A.; Chen, W., Simple conjugation and purification of quantum dot-antibody complexes using a thermally responsive elastin-protein L scaffold as immunofluorescent agents. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128 (46), 14756-14757.
- [65] Susha, A.; Javier, A.; Parak, W.; Rogach, A., Luminescent CdTe nanocrystals as ion probes and pH sensors in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2006, 281 (1-3), 40-43.
- [66] Liu, Y.; Sun, Y.; Vernier, P.; Liang, C.; Chong, S.; Gundersen, M., pH-sensitive photoluminescence of CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots in human ovarian cancer cells. *Journal of Physical Chemistry C* 2007, 111 (7), 2872-2878.
- [67] Herrero-Latorre, C.; Alvarez-Mendez, J.; Barciela-Garcia, J.; Garcia-Martin, S.; Penacreciente, R. M., Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: a review. *Analytica Chimica Acta* 2015, 853, 77-94.
- [68] Vashist, S.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J.; Sheu, F., Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnology Advances* 2011, 29 (2), 169-188.
- [69] Li, J.; Pandey, G. P., Advanced physical chemistry of carbon nanotubes. *Annual Review of Physical Chemistry* 2015.
- [70] Yang, N.; Chen, X. P.; Ren, T. L.; Zhang, P.; Yang, D. G., Carbon nanotube based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 207, 690-715.

- [71] Girifalco, L.; Hodak, M.; Lee, R., Carbon nanotubes, buckyballs, ropes, and a universal graphitic potential. *Physical Review B* 2000, 62 (19), 13104-13110.
- [72] Peng-Cheng Maa, N. A. S., Gad Maromb, Jang-Kyo Kima, Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: a review. 2010, 41 (10), 1345-1367.
- [73] Di Crescenzo, A.; Ettore, V.; Fontana, A., Non-covalent and reversible functionalization of carbon nanotubes. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2014, 5, 1675-1690.
- [74] Gao, C.; Guo, Z.; Liu, J.; Huang, X., The new age of carbon nanotubes: an updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. *Nanoscale* 2012, 4 (6), 1948-1963.
- [75] Tuncel, D., Non-covalent interactions between carbon nanotubes and conjugated polymers. *Nanoscale* 2011, 3 (9), 3545-3554.
- [76] Sanchez, S.; Roldan, M.; Perez, S.; Fabregas, E., Toward a fast, easy, and versatile immobilization of biomolecules into carbon nanotube/polysulfone-based biosensors for the detection of hCG hormone. *Analytical Chemistry* 2008, 80 (17), 6508-6514.
- [77] Viswanathan, S.; Rani, C.; Anand, A.; Ho, J., Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 2009, 24 (7), 1984-1989.
- [78] Malhotra, R.; Patel, V.; Vaque, J.; Gutkind, J.; Rusling, J., Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification. *Analytical Chemistry* 2010, 82 (8), 3118-3123.
- [79] Munge, B.; Fisher, J.; Millord, L.; Krause, C.; Dowd, R.; Rusling, J., Sensitive electrochemical immunosensor for matrix metalloproteinase-3 based on single-wall carbon nanotubes. *Analyst* 2010, 135 (6), 1345-1350.
- [80] Chen, Y.; Huang, J., Electrochemical sensing of bovine serum albumin at self-assembled SWCNTs on gold. *Diamond and Related Materials* 2009, 18 (2-3), 516-519.
- [81] Su, H.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhuo, Y.; Hong, C.; Liu, Z.; Yang, X., Multilayer structured amperometric immunosensor built by self-assembly of a redox multi-wall carbon nanotube composite. *Electrochimica Acta* 2009, 54 (17), 4149-4154.
- [82] Jacobs, C.; Peairs, M.; Venton, B., Review: carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta* 2010, 662 (2), 105-127.
- [83] Freitas, T.; Mattos, A.; Silva, B.; Dutra, R., Amino-functionalization of carbon nanotubes by using a factorial design: human cardiac troponin T immunosensing application. *Biomed Research International* 2014.
- [84] Yao, J.; Sun, Y.; Yang, M.; Duan, Y. X., Chemistry, physics and biology of graphene-based nanomaterials: new horizons for sensing, imaging and medicine. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22 (29), 14313-14329.

- [85] Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A., Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 2004, 306 (5696), 666-669.
- [86] Zhang, L.; Zhou, R.; Zhao, X., Graphene-based materials as supercapacitor electrodes. *Journal of Materials Chemistry* 2010, 20 (29), 5983-5992.
- [87] Lawal, A. T., Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors. *Talanta* 2015, 131, 424-443.
- [88] Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J.; Potts, J.; Ruoff, R., Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced Materials* 2010, 22 (46), 5226- 5226.
- [89] Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J.; Potts, J.; Ruoff, R., Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced Materials* 2010, 22 (35), 3906- 3924.
- [90] Chung, C.; Kim, Y.; Shin, D.; Ryoo, S.; Hong, B.; Min, D., Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of Chemical Research* 2013, 46 (10), 2211-2224.
- [91] Chen, D.; Feng, H. B.; Li, J. H., Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chemical Reviews* 2012, 112 (11), 6027-6053.
- [92] Dreyer, D.; Park, S.; Bielawski, C.; Ruoff, R., The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* 2010, 39 (1), 228-240.
- [93] Shan, C.; Yang, H.; Han, D.; Zhang, Q.; Ivaska, A.; Niu, L., Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25 (5), 1070-1074.
- [94] Luo, J.; Jiang, S. S.; Zhang, H. Y.; Jiang, J. Q.; Liu, X. Y., A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode. *Analytica Chimica Acta* 2012, 709, 47-53.
- [95] Mao, S.; Lu, G.; Yu, K.; Bo, Z.; Chen, J., Specific protein detection using thermally reduced graphene oxide sheet decorated with gold nanoparticle-antibody conjugates. *Advanced Materials* 2010, 22 (32), 3521-+.
- [96] Zhong, Z.; Wu, W.; Wang, D.; Wang, D.; Shan, J.; Qing, Y.; Zhang, Z., Nanogold-enwrapped graphene nanocomposites as trace labels for sensitivity enhancement of electrochemical immunosensors in clinical immunoassays: carcinoembryonic antigen as a model. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25 (10), 2379-2383.
- [97] Huang, J. L.; Tian, J. N.; Zhao, Y. C.; Zhao, S. L., Ag/Au nanoparticles coated graphene electrochemical sensor for ultrasensitive analysis of carcinoembryonic antigen in clinical immunoassay. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 206, 570-576.

- [98] Tang, J.; Tang, D.; Niessner, R.; Chen, G.; Knopp, D., Magneto-controlled graphene immunosensing platform for simultaneous multiplexed electrochemical immunoassay using distinguishable signal tags. *Analytical Chemistry* 2011, 83 (13), 5407-5414.
- [99] Teixeira, S.; Burwell, G.; Castaing, A.; Gonzalez, D.; Conlan, R. S.; Guy, O. J., Epitaxial graphene immunosensor for human chorionic gonadotropin. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2014, 190, 723-729.
- [100] Xu, S.; Liu, Y.; Wang, T.; Li, J., Positive potential operation of a cathodic electrogenerated chemiluminescence immunosensor based on luminol and graphene for cancer biomarker detection. *Analytical Chemistry* 2011, 83 (10), 3817-3823.
- [101] Li, L. L.; Liu, K. P.; Yang, G. H.; Wang, C. M.; Zhang, J. R.; Zhu, J. J., Fabrication of graphene-quantum dots composites for sensitive electrogenerated chemiluminescence immunosensing. *Advanced Functional Materials* 2011, 21 (5), 869-878.

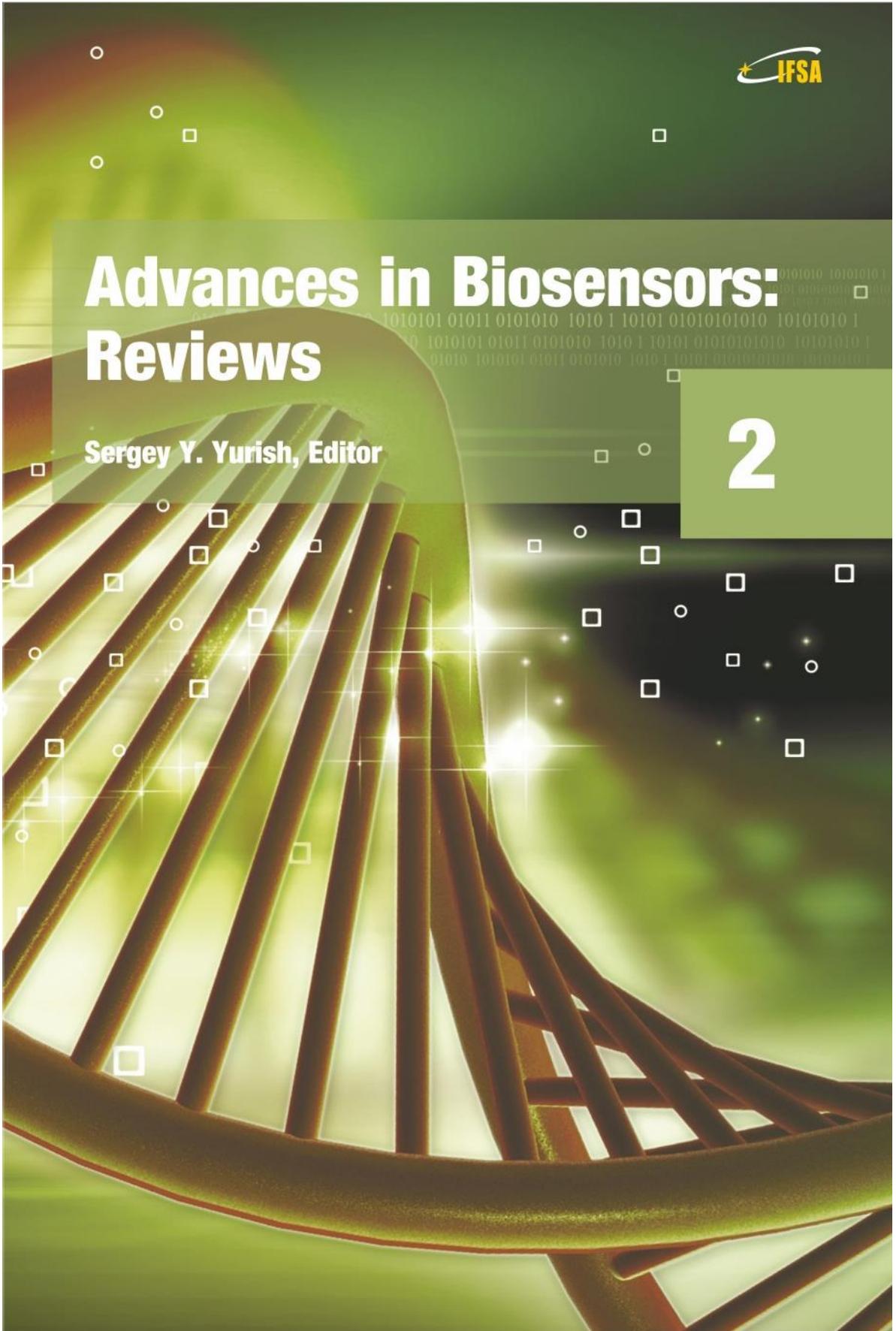
**APÊNDICE B - CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO
ADVANCES IN BIOSENSORS: REVIEWS**



Advances in Biosensors: Reviews

Sergey Y. Yurish, Editor

2



S. Yurish
Editor

Advances in Biosensors: Reviews

Volume 2



International Frequency Sensor Association

Advances in Biosensors: Reviews, Volume 2

Published by IFSA Publishing, S. L., 2018
E-mail (for print book orders and customer service enquires):
ifsa.books@sensorsportal.com

Visit our Home Page on <http://www.sensorsportal.com>

Advances in Biosensors: Reviews, Vol. 2 is an open access book which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the authors. This is in accordance with the BOAI definition of open access.

Neither the authors nor International Frequency Sensor Association Publishing accept any responsibility or liability for loss or damage occasioned to any person or property through using the material, instructions, methods or ideas contained herein, or acting or refraining from acting as a result of such use.

ISBN: 978-84-09-05394-0
e-ISBN: 978-84-09-05393-3
BN-20180930-XX
BIC: TCBS



Preface

Preface

After successful publication of '*Advances in Biosensors: Reviews*', Vol. 1, Book Series in 2017, and feedback from our authors and readers, we have decided to publish the second volume in 2018. The 2nd volume is also an open access book and available in both formats: electronic and paper (hardcover).

The global biosensors industry is approaching towards multi-billion market. The modern biosensors market growth is driven by the continuous technological advancements in the biosensors ecosystem, increase in the use of biosensors for nonmedical applications, lucrative growth in point-of-care diagnostics, and rise in the demand for glucose monitoring systems. Increasing applications in diagnosis of various diseases and development of nanoparticle based electrochemical biosensors significantly stimulates growth of biosensors industry.

The second volume of '*Advances in Biosensors: Reviews*', Book Series contains six chapters written by 24 authors from 7 countries: Brazil, China, Denmark, Japan, South Africa, Sweden and Ukraine.

Chapter 1 focuses on the design and fabrication of photo-electrochemical biosensors and their potential applications in analytical detection of some clinically significant biochemical molecules. The working principles and nanostructured construction of such biosensors for enhanced performance are described. Some striking examples are highlighted. The current-status and critical challenges are summarized, and the outlook of this newly emerged type of biosensors is prospected.

Chapter 2 describes point-of-care electrochemical immunosensors applied to diagnostic in health. Particular attention is given on advanced immunosensors based on carbon allotropes and metal nanoparticles.

Chapter 3 is dedicated to the multifrequency bioimpedance analysis, a non-invasive electrical method for monitoring blood and water volume of patients, and the experimental and theoretical developments of the QCM and QCM-D sensors used for the cells- artificial membranes interactions and in blood coagulation studies.

Chapter 4 reflects on the advances of solid-state colorimetric biosensors. The subsections are divided in terms of the solid support material used.

Chapter 5 describes a sensing of H₂O₂ as cancer biomarker with layered doubled hydroxides nanostructures. A new avenue to design afterward generation of bionanoelectronics and miniaturized biosensors as sensitive cancer detection probe is provided.

Chapter 6 describes highly reliable metallization on polymer and their fundamental characteristics toward wearable devices applications.

I hope that readers will enjoy this new volume and that can be a valuable tool for those who are involved in research and development of different biosensors and biosensing systems.

I am looking for any advices, comments, suggestions and notices from the readers to make the next volumes of becoming popular '*Advances in Biosensors: Reviews*' Book Series.

Sergey Y. Yurish,

Editor IFSA Publishing

Barcelona, Spain

Contributors

Muhammad Asif, Key Laboratory of Material Chemistry and Service Failure, School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, P. R. China

Ayesha Aziz, Key Laboratory of Material Chemistry and Service Failure, School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, P. R. China

Diego G. A. Cabral, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil

Tso-Fu Mark Chang, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan
CREST, Japan Science and Technology Agency, Yokohama, 226-8503, Japan

Chun-Yi Chen, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan
CREST, Japan Science and Technology Agency, Yokohama, 226-8503, Japan

Qijin Chi, Department of Chemistry, Technical University of Denmark, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark, E-mail: cq@kemi.dtu.dk;
Tel.: +45 45252032; Fax: +45 45883136, Denmark

Wan-Ting Chiu, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan
CREST, Japan Science and Technology Agency, Yokohama, 226-8503, Japan

Rosa F. Dutra, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil
E-mail: rosa.dutra@ufpe.br

Paula A. B. Ferreira, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil

Leonid Y. Gorelik, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden

Tomoko Hashimoto, Department of Clothing Environmental Science, Nara Women's University, Nara, 630-8506 Japan

Hironmichi Kurosu, Department of Clothing Environmental Science, Nara Women's University, Nara, 630-8506 Japan

Hongfang Liu, Key Laboratory of Material Chemistry and Service Failure, School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, P. R. China

Nokuthula Ngomane, School of Chemical and Physical Sciences,

University of Mpumalanga, Mbombela, 1200, South Africa

Mitsuo Sano, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan
CREST, Japan Science and Technology Agency, Yokohama, 226-8503, Japan

Gilvânia M. de Santana, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil

Anne K. S. Silva, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil

Evgen I. Sokol, Kharkiv National Technical University, KhPI, Kharkiv, Ukraine

Masato Sone, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan
CREST, Japan Science and Technology Agency, Yokohama, 226-8503, Japan

Erika K. G. Trindade, Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Brazil

Marina V. Voinova, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden

Zhengyun Wang, Key Laboratory of Material Chemistry and Service Failure, School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, P. R. China

Byung-Hoon Woo, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8503, Japan

Yao Wu, Department of Chemistry, Technical University of Denmark, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark

Chapter 2

Point-of-Care Electrochemical Immunosensors Applied to Diagnostic in Health

*Diego G. A. Cabral, Gilvânia M. de Santana,
Paula A. B. Ferreira, Anne K. S. Silva, Erika K. G. Trindade
and Rosa F. Dutra¹*

2.1. Introduction

Point-of-care testings (PoCT) have been recognized as very attractive devices for decentralization of analytical operations, being mainly developed to diagnostics that require rapid interventions, such as cardiovascular diseases, drug intoxication, emergency preparedness to surgical procedures, containment of transmissibility and spread of infectious diseases, and surveys in endemic or epidemic outbreaks [1]. Another interesting application of PoCTs devices is addressed continuous monitoring of markers that require recurrent evaluations, glicemy or mostly in therapies and prolonged treatments of diseases like the cancer, being also benefit for treatment and monitoring of patients that live in remote areas, far from central laboratories. In these situations, the conventional laboratorial testings become impracticable, since samples are transported to laboratory site, processed and results returned to the doctors. Challenges in developing of PoCs for medical diagnostics is to combine the advantages of fast response, low cost and user friendly processing, without loss of diagnostic sensibility and specificity when is compared to laboratorial analyses.

PoCTs are analytical devices designed to be used near the bedside, reducing the turnaround time of the diagnostic cycle, being usually rapid (up to 30 minutes). PoCT are simple tests processed outside hospital or laboratory that do not require skilled personnel for management [2]. Currently, PoCT tests are considered practical and economical methods, being nowadays considered as one of the most attractive analytical possibilities, compared to the chemical analysers, immunoanalyzers, PCR (polymerase chain reaction) and others analysers [2]. Among PoCT devices, lateral flow assays (LFA) and biosensors addressed to immunoassays are more economically profitable than enzymatic assays, especially regarding to laboratorial analyses.

Lateral flow assays (LFA) immunochromatographic tests are paper-based assays that use immobilized antibodies or antigens to capture target analytes in samples. A color band resulted from molecule (antigen or antibody) or material labeling reveals this reaction, usually supplying qualitative results. However, additional image resources can be used to produce quantitative data based in contrast and brightness of color band [3]. A typical LFA is formed by overlapping membranes mounted on an inert rigid support, which confers stability and facilitates handling of the test [4]. The tip of the strip has a sample pad made of adsorbent material, where the sample is applied. The samples are transported by capillarity to the conjugation pad containing the labeled antibodies for biorecognition. The interaction between the target analytes and these antibodies form complexes that migrate to the reaction zone, usually formed by a nitrocellulose membrane. In this zone, there are two lines of immobilized antibodies, one to the target molecule and the control to define the results [8]. A schematic design of a LFA is shown in Fig. 2.1. On the last few decades, advances of nanotechnology has allowed incorporation of gold nanoparticles to LFA, improving the sensitive of the analytical testings [7]

Rosa F. Dutra
Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Brazil

Currently, LFA immunoassay have been developed to several applications, allowing the screening of infectious diseases (HIV, viral hepatitis, tuberculosis and herpes simplex virus, etc.) [8]. LFA has also been applied to point-of-care detection of cardiac markers such as troponin, H-FABP, hepatitis and others, possibility a semi-quantitative analysis, but it is quite limited, because the results are color band-dependents, thus the results are subject of human error of interpretation [9].

In attempting to overcome the limitations denoted by LFA, contrary, immunosensors supply a quantifiable signal, and the amount of analyte detected are proportional to the analyte concentrations, independently of detected species: antibodies, antigens, enzymes, or other chemical species. The interest for immunosensors has been exponentially growing on the last decades due to combine advantages of high sensitivity, user-friendly processing and portability, beside to present a low cost per analyses (Fig. 2.2).

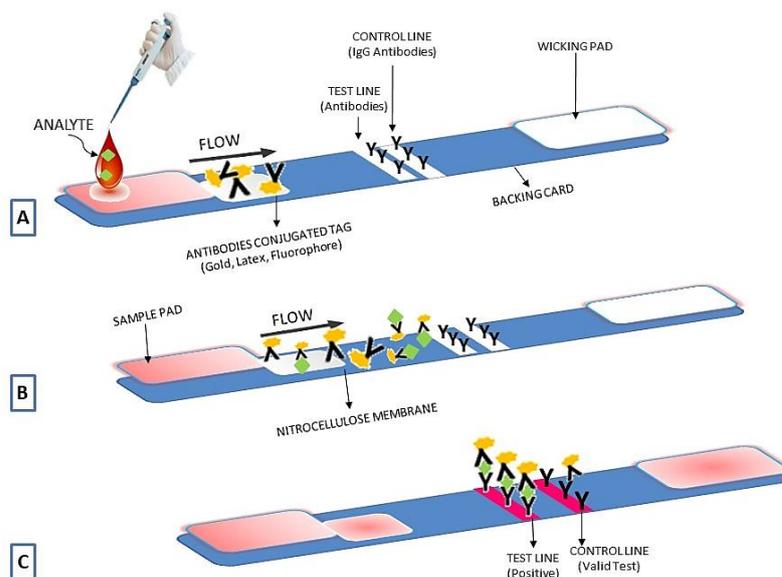


Fig. 2.1. Schematic design of Lateral Flow Immunoassay at different steps: (A) adding the samples containing antigens and immunoglobulins; (B) migration of antigens complexed with labelled antibodies, and (C) immunocomplex formed and immunoglobulins are positioned by affinity on the paper regions where labelled antibodies are exhibited by a color band.

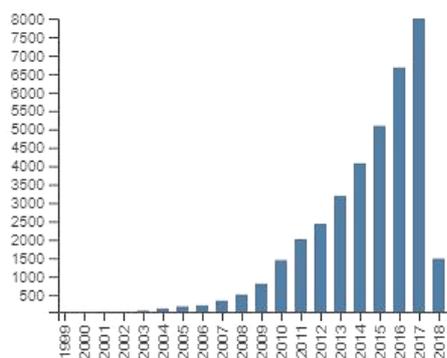


Fig. 2.2. Number of citation over the last decades (Extracted from Web of Science base: ["immunosensor" OR "electrode" OR "biosensor"] AND ["point-of-care"] in March 2018).

2.2. PoCT Electrochemical Immunosensor

Immunosensors are based on the specific antigen-antibody interactions causing a perturbation on the electrode surface by molecule capturing by immobilized antigens or antibodies; this perturbation is

converted into measurable signals by a transducer. In general, the signal is amplified, processed and readout in output display [10]. Specificity of immunosensors is mainly resulted from the high affinity of antigen-antibody. Monoclonal and polyclonal antibodies can be used in immobilization technique developments, but the monoclonal classes are more attractive due to recognize only a one epitope of an antigen, being more specific, even if it has a higher cost. [11] Recombinant antigens have been recently utilized to produce antibodies with more selectively, in order to recognize only one epitope region.

Screen-printed electrode (SPE) has contributed to the great potential of PoCT. Recent developments in the SPE have possibilited the layer-by-layer printing of commercial or self-made inks onto different types of rigid and flexible substrates. Conventionally, SPE is one sensing unit with three printed electrodes, including a working electrode, a counter electrode and a reference electrode. The composition of the inks chosen in the printing process is essential to the selective determination intended for each analysis [12]. Commonly, SPE is based on amperometric transduction by changes in the current signals of a system submitted to a controlled potential (constant or periodic). In general, the current is generated by diffusion of electroactive redox species of the electrolyte/electrode interface-dependent that are proportional to the binding event, i.e. antigens or antibodies captured.

Inumerous point-of-care immunosensors using amperometric transduction have been developed for clinical diagnostic, such as for HIV [13], prostate specific antigen (PSA) [14], celiac disease [15], cardiac troponin T [16] and cardiac troponin I [17]. Other transducer types using the SPE have been also described in the literature, measuring impedance [18] or capacitance [19]

Recent advances in the SPE development for clinical diagnostic were obtained with progress in the synthesis of nanostructured materials. Metallic nanoparticles, nanowires, carbon nanotubes, graphene, and their respective nanocomposites have been included either in pastes or in subsequent step on the working electrode [20]. Such nanomaterials are used to improve the immobilization efficiency of biomolecules and accelerate the rate of charge transfer on the electrode surface as well as to optimize electrochemical mediation to amplify signals strongly. In this context where design is a critical parameter, it is possible to construct effective miniature devices capable of producing reproducible results with safe operations and high sensitivity for biochemical detection [21].

2.3. Advances on PoCT Immunosensors

Nanomaterials have improved the efficiency and reliability of electrochemical PoCT immunosensors, allowing a lower limit of detection in the concentrations of antigens or antibodies present in biologic fluid samples that was not possible. Nanomaterials can be defined based on size parameter(s), being under 100 nm sized in, at least, one dimension. Commonly, in nanoscale, these materials present new properties that are not normally observed, when they are in bulk. These alterations are obtained by the quantum effects of size, being especially evident in carbon allotropes and metal nanoparticle [22, 23]. For this reason, it is clear that the progress of bioanalytical assays will rely heavily on innovations in nanotechnology [24, 25].

Several nanomaterials have contributed to electrochemical immunosensor developments, among them metal nanoparticles, metal oxides nanoparticles, carbon nanotubes, graphene, their corresponding nanocomposites and quantum dots are more commonly employed (Fig. 2.3) [26].

2.3.1. PoCT Immunosensors Based on Carbon Allotropes

Recently, the contribution of carbon allotropes in the construction of electrochemical immuno-PoCTs has gained prominence due to the small size of the carbon atoms and the number of electrons they can share, allowing the formation of several bonding patterns and stable versatile materials with excellent intrinsic properties such as electrical conductivity, large surface area, ease of functionalization and biocompatibility [27].

Carbon nanotube

Among the nanostructures synthesized from carbon allotropes we can highlight the nanotubes, which were discovered in 1991 by Iijima, enabling interaction with biomolecules for biosensor applications [28]. Carbon nanotubes (CNT) can be described as hexagonal arrangements in cylindrical format, held by Van der Waals interactions in the adjacent layers. They promote rapid electron transfer, increasing the reaction rate of many electroactive species, and then decreasing the electrode response time of the Immuno-PoCTs, thereby achieving high sensitivity with low detection limits [29]. With respect to the structure the CNT can be classified in two forms: single wall nanotubes (SWCNT), formed by a single layer of carbon atoms arranged in a hexagonal way, and multiple wall nanotubes (MWCNT), which consists of multiple layers of carbon atoms arranged in a hexagonal way arranged around a central area. The length of the CNT can range from nanometers to centimeters, but the diameter varies in the order of nanometers, depending on the type of CNT [30].

Activation or functionalization of CNTs by oxidation treatment introduces chemical functional groups, including alcoholic, carboxylic, aldehydic, ketonic, and esteric oxygenated functional groups [31]. These groups allow a greater interaction between CNTs and antibodies, enabling them to immobilize more molecules on the sensor surface facilitating non-random binding and exposing their binding sites or antigenic regions to their target analytes (Fig. 2.4) [32].

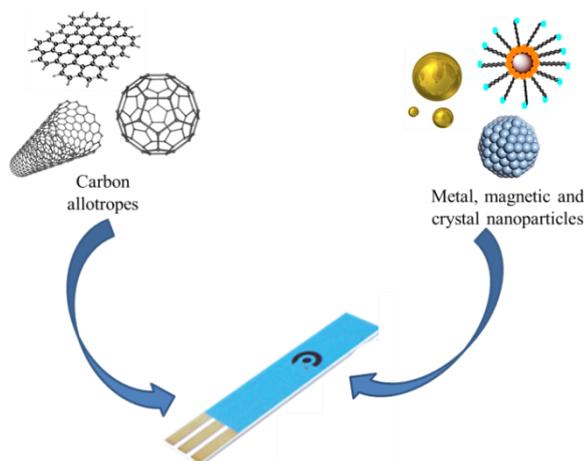


Fig. 2.3. Nanomaterials with potential application in PoCT device. Nanomaterials can work as carriers or reporters for signal generation or powerful amplification in the transduction systems. Their nanobioapplication in SPE has been very promising.

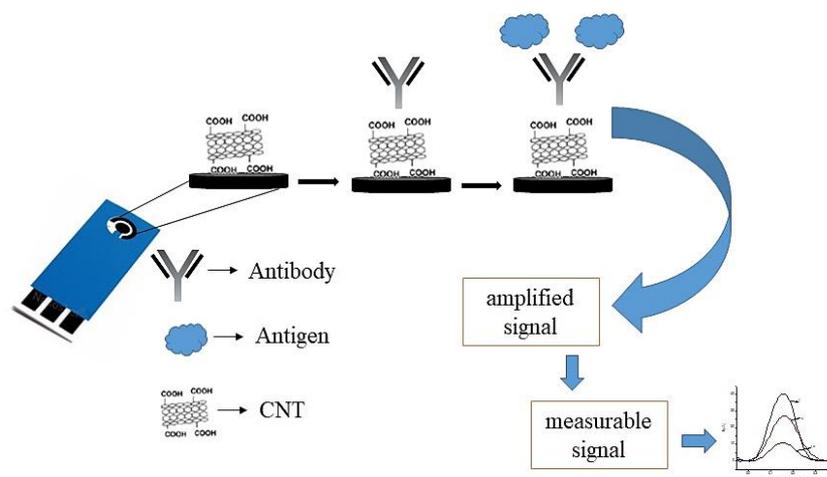


Fig. 2.4. Use of CNTs to detect the interaction between antigen-antibody in PoCT.

Studies have shown that CNTs interact with other materials, improving the intrinsic qualities of the PoCTs immunosensor. Dias et al. [33], (2013) produced a dengue virus (non-structural protein 1) immuno-PoCT based on a homogeneous mixture consisting of carboxylated carbon nanotubes dispersed in carbon paint as a printed working electrode. The effect of the matrix, as well as the performance of the assays, was successfully evaluated using the spiked blood serum sample, obtaining excellent recovery values in the results. The carbon nanotubes incorporated into the carbon paint improved the reproducibility and sensitivity of the CNT-SPE immunosensor. In another work, Silva et al. [34] (2013) developed a label-free immunosensor based on printed electrodes for carbon nanotubes functionalized with amine groups to detect cardiac troponin. PoCT was developed by the homogenization between the carbon paint and the amine carbon nanotubes on a polyethylene terephthalate substrate for thin films. The use of carbon nanotubes increased the reproducibility and stability of the sensor, and the amine groups allowed the non-random immobilization of antibodies against cardiac troponin T.

Aiming to allow the orientation of Carbon Nanotubes in the detection surface, polymer films have been commonly employed. The polymers interact with the CNT through the functional groups ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) and may form nanocomposites or nanohybrids. As examples we can cite the work of Sanchez-Tirado et al. [35], (2017) where dual screen-printed carbon electrodes modified with 4-carboxyphenyl-functionalized double-walled carbon nanotubes were used for the preparation of electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of the cytokines Interleukin- 1β (IL- 1β) and factor necrosis tumor α (TNF- α). In addition, the dual immunosensor exhibits excellent reproducibility of the measurements, storage stability and selectivity as well as negligible crosstalk. In recent years, studies have shown that the use of CNT combined with conductive polymers can improve sensitivity and increase electron transfer on the sensor platform. In another study Gomes et al. [36], (2013) produced a nanostructured SPE immunosensor based on carbon nanotubes supported by a conductive polymer film for detection of cardiac Troponin T (cTnT). The combined use of polyethyleneimine (PEI) film and CNT provided important advantages for obtaining a highly sensitive analytical method for cTnT.

Graphene

Another prominent carbon nanomaterial is graphene (G). It is a 2D material of atomic thickness, formed by carbon atoms with sp^2 hybridization, forming a structure of hexagonal shape similar to a honeycomb lattice. The characterization and identification of graphene was first performed in 2004, through successive stages of graphite exfoliation using commercial adhesive tapes [37]. Among its remarkable properties, we can cite transparency of the sheets (optical transmittance of $\sim 97.7\%$) and large surface

area ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Furthermore, it is a good heat conductor (thermal conductivity of $500 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), chemically inert and a semimetal with high electron transfer (charge mobility of $250\,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in room temperature) [38].

According to its physical and chemical characteristics we can find several forms of graphene, among them Graphene Oxide (GO) and Reduced Graphene Oxide (RGO), which, because of their particularities, are highly attractive for the assembly of sensor surfaces [39]. GO has two dimensions, consisting of an hexagonal network of Sp^2 bonds between carbon atoms (CC) and by Sp^3 bonds with oxygen atoms (CO) forming carboxyl groups (-COOH), hydroxyls (-OH) or epoxy (-O-). This makes GO an excellent material for biological applications, since its functional groups readily interact with nucleic acids, proteins, cells, and other organic molecules [40]. Yukird et al. [41], (2017) developed an electrochemical immunosensor based on a nanohybrid formed by graphene and polyaniline (G/PANI). Electrospaying of G/PANI increased the electrode surface area while electropolymerization of aniline increased the number of amino groups (-NH₂) for antibody immobilization.

Reduced graphene oxide is another material that has been widely used in immunoelectrochemical analysis, due to its high effective surface area and high electrical conductivity [42]. It is produced from reduction of GO via thermal, chemical, electrochemical and laser-scribing methods. In RGO synthesis, functional groups are removed and the conductivity is increased again [40]. As examples of the use of graphene for the production of Immuno-PoCTs we can mention the work of Silva et al., (2016) [43], that produced a biomimetic sensor for the detection of Troponin T based on a nanocomposite formed by the conjugation of RGO and Polipyrrole. Another example is Lee et al. [44] (2017), who developed an electrochemical immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen. In this method, silver nanoparticles were mixed with RGO to modify the surface of screen-printed carbon electrode.

2.3.2. PoCT Immunosensors Based on Metal Nanoparticles

Metal nanomaterials have been aroused interest due to their special optical and electrocatalytic properties. They are often incorporated by adhesion or binding to the robustly modified transduction platforms. Fantastic devices with enhanced capabilities for health applications can be fabricated by the assembly of nanoparticles and immunocomponents [45]. In addition to maintain the bioreceptors, metal nanoparticles can work as electronic conduction vehicles in electrochemical biosensors, which allow electrons produced in bioreactions to be transported to sensing electrodes or convert other physiochemical changes to measurable signals that are proportional to the analyte concentration [46]. Metal nanostructures, semiconductor nanoparticles and metal oxide nanostructures have been considered as potential signal labels when attached to secondary antibodies to stimulate the development of signal amplification strategy for immunosensing [47].

Gold nanoparticles

Gold is an inert metal in macroscale, but gold nanoparticles (GNPs) are adopted nanomaterial often explored as detectable labels to enhance a suitable signal, thereby providing an intense, pronounced and vivid mark. The color change of GNPs are observable with bare eye. This optical property of revelation in visible color is valuable especially in colorimetric assays [48]. Although they have a higher cost, they present high conductivity, excellent biocompatibility, superior stability, low toxicity, relatively simple production and modification [49]. Thus, colloidal GNPs have been used to modify solid electrodes and has shown advantages in feasibly attachment of the immunological molecules and the electron transfer that increase the electrochemical signals. The strong affinity for the amino groups is explored and gold provide a microenvironment compatible with biomolecules, remaining their activity even after immobilization [50]. Moreover, the formation of self-assembled monolayers (SAMs) through oriented Au-S bonds affords great attention to gold toward SPEs for adhesion of more components. Gold SPE helps to deposit antibody in close vicinity with transducer and GNPs help to cast antibody in close vicinity with the antigen and hence results in the increase of sensitivity until femtogram level [51]. Also, Jacobs and coworkers [52] have proposed an immunosensors for ultrasensitive detection of troponin-T based on antibody conjugated to GNPs. Using electrochemical

impedance spectroscopy, the interdigitated sensor was able to detect concentrations in femtogram per milliliter (fg/mL) of this cardiac marker. Recently, Sabouri et al. [53] have developed a sensitive immunosensor for detection of Hepatitis B virus based on GNPs. HbsAg was targeted by a primary antibody and a secondary antibody co-immobilized on luminol-GNPs, with detection limit of 14 pg/mL.

Silver nanoparticles

Silver is a relatively cheap noble metal that exhibit superior properties over gold on the nanoscale, mainly of optical nature [54]. Its optical profile exhibits the sharpest and most intense bands among metals [55]. Consequently, for convenience, colorimetric assays are prevalent with silver nanoparticles (SNPs) by the straightforward color change discrimination. They can be oxidized more easily and offer improved electrochemical activity, making them good candidates for detection tags in electrochemical sensing. The utilization either naked or conjugated with recognition probes as signal transduction elements for analyte detection in biosensors was shown to improve the detection limits and enhance their diagnostic performance [56]. For this, silver nanostructures need to be associated with recognition molecules that can selectively detect and capture the analyte of interest. However, the functionalization still is a challenging process. They are less stable in aqueous dispersions and are susceptible to oxidation and etching by chloride ions. By their limited stability and difficulty to functionalize, SNPs have become less popular [57]. Considering practical situations, Hao et al. [58] have developed a direct electrochemical detection approach to assay generically proteins by using SNPs labels coupled covalently with antibody on a SPE. The detection limit found was 0.4 ng/mL. Now, Felici and colleagues [59] have described a novel prototype of label-free mmunosensors using SPE and exploiting SNPs as a backing material and electrochemical tracker. Che and coworkers [60] have constructed an amperometric mmunosensors for the determination of α -1-fetoprotein, a tumor marker found in several malignant diseases. Multiwalled carbon nanotube-silver nanoparticle composite modified on the surface of a glassy carbon electrode leading a detection limit of 0.08 ng/m. Similarly, Ibupoto and colleagues [61] have described a new potentiometric mmunosensors for the selective detection of d-dimer using SNPs decorated ZnO nanotubes anchored to antibodies. D-dimer is a biomarker found at high levels in deep vein thrombosis disorders. It was found a detection limit of 1.00×10^{-6} μ g/mL.

Magnetic nanoparticle

Comparatively, magnetic nanoparticles (MNPs) are cheaper to produce, being considered physically and chemically stable, biocompatible and environmentally safe. Magnetic labels have certain peculiarities for biosensing applications, like absence of preprocessing stage for sample purification, since biological entities do not show any magnetic behavior or susceptibility and therefore, no interferences or noise is to expect during signal capturing [62]. Hence, they are also important items for biomedical applications involved in LFA systems as a colored reagent, possessing strong brown coloration. One promising utility is magnetic preconcentration before the detection event. MNPs conjugated to bioreceptor unit can simply be mixed in solution to interact specifically with the analyte. They offer the convenience of separation via external magnetic field, permitting them easily be attracted with a small magnet, losing their magnetic effect when the field is removed. This way, these nanoparticles can be efficiently separated and isolated from the solution [56]. However, the main strategy is the integration of MNPs into the transducer element or the modification of the sensor surface. Despite a wide range of ferromagnetic materials, iron oxides (Fe_2O_3 and Fe_3O_4) are most commonly used for generation or amplification of analytical signal [63]. Employing proper functionalization methods, some notable benefits are achieved such as rapid analysis process, better stability and low detection limit. Besides, they are fluorescent alternatives that offer ease of handling, low production cost and smaller size of final fabricated device when compared to fluorophores [64]. For instance, combining the aforementioned trends, a novel amperometric magnetoimmunoassay based on MNPs pulled by magnetic field on the screen-printed carbon electrodes surface was developed for the selective determination of *Legionella pneumophila*. The achieved limit of detection by Martín et al. was 104 Colony Forming Units (CFUs)/mL [65]. Singh and Krishnan achieved the

first serum insulin voltammetric immunosensor for clinical diagnosis of type 1 and type 2 diabetic disorders. It was reported a lower detection limit of 5 pM for free insulin present in serum using functionalized magnetite nanoparticles [66].

Metal oxide nanoparticles

Zinc oxide (ZnO) also belong group of elite nanomaterials with inherent optical, and piezoelectric properties. It is a semiconducting material that exhibits biomimetic, high catalytic efficiency, little toxicity, low biodegradability, and stable immobilization of proteins due to high isoelectric point without distorting their bioactivity [67]. Beside good electron transfer, this metal oxide nanoparticle denotes a strong adsorption capability, offering numerous sites to antibodies, enzymes and proteins which make them choice for biosensors. It should be conjugated with biological molecules without losing the integrity [68]. For example, a glucose electrochemical sensor based on ZnO nanorods was investigated by Marie and coworkers [69]. The lower limit of detection was 0.22 μM . And a microfluidic immunosensor applied in congenital hypothyroidism screening was presented by Seia and colleagues [70]. ZnO nanobeads were employed as platform for monoclonal antibody immobilization to specifically capture thyrotropin hormone. The electrochemical detection limit of glass microchip was 0.00087 $\mu\text{UI mL}$.

2.4. Lab-On-A-Chip Based Immunosensors

Due to the in-depth knowledge of nanomaterials, great advances were achieved, making it possible to implement confined labs on a single chip or laboratory analysis system. Lab-on-a-chip combines analysis, reaction and processing in a single microchip, i.e., the ability to gather multiple key functions of a size reduced laboratory on an electronic device with a few square centimeters, which typically manipulates human fluids in the order of microliters to nanoliters [26]. This approach have been extensively applied in point of care devices due to advantages such as compactness, mobility, integrability, modularity, reconfigurability, embedded computing, limited power consumption and minimum need to sample and reagent when enormous amounts of volume are not available [71]. Additionally, lab-on-chip platforms are hermetically enclosed with precise control conditions, avoiding evaporation and minimizing the risk of contamination by potentially infectious biological specimens [72]. Regarding personalized healthcare, the multiple detection by a single PoCT is an important trend which could replace time-consuming laboratory analyses [73]. In addition to releasing results in minutes, they play an important role in management and early investigation of diseases and outbreaks [74]. One of the purposes is the development of a chip-based, miniaturized and portable system that allows for the assay of different analytes in complex samples. In this way, many researches in the scientific community have focused on paper-based and printed electrode technologies as approaches for fabricating these diagnostic systems. These technologies are affordable, user-friendly, rapid, and scalable for manufacturing. Moreover, the association with nanomaterials provides a path for the development of highly sensitive and selective biosensors for prospective generation POC tools [21].

Paper-based microfluidics or lab on paper is a novel system for handling and analysis of fluid extracellular for a variety of medical applications, such as healthcare and screening [75]. This technology presents simplicity, portability, disposability, low-cost and allows the automation of multi-step processes [76]. Nitrocellulose membrane, chromatography paper and filter paper are attractive substrates for fabricating microfluidic device, because they are natural, porous, ubiquitous and inexpensive materials. Confining solvents and reagents in specific points, paper can drive and regulate aqueous movement passively using capillary forces without supplying of some kind of external energy, and the migration perform the sorting, mixing and uniform separation of the liquid samples diffused [77]. Furthermore, the chemical composition of paper permits the covalent bonding of bioactive compounds onto the surface. On the other hand, some obstacles to become an ideal PoCT are liquid evaporation, sample retention and nonspecific adsorption. These adversities could lead to false response errors and decreased sensitivity [21]. Its mode of construction is creating a set of

microchannels bounded by hydrophobic barriers patterned on paper substrates with the flow is conducted within the hydrophilic channels and consequently, fluid can be coordinated of a controlled mode. Two-dimensional (2D) and three-dimensional 3D microfluidic channels have been already built on paper, being able to transport biological liquids injected separately by pathways for performing assays and quantifying concentrations of distinct analytes [78]. Printing is the one of the most commonly used techniques to achieve minimal consumption of hydrophobic material [79]. A wave of advancements in 3D printing technology to simplify in agile designing and fabrication supports the durability, flexibility and performance of PoC microfluidic [80].

Different detection methods have been employed for a semi-quantitative detection, analytical assays based on colorimetric method, the results can be visually verified to the unaided eye or interpreted by a reader [81]. Nevertheless, fluorescence or electrochemical methods have become more widespread and attractive because of their high accuracy, sensitivity and lower limit of detection. Further, electrochemistry is less subject to the interference compounds exposed in the biological specimens, because it is not affected by ambient lighting conditions [21]. Colorimetric revealing has been expansively applied due to its simplicity and compatibility with cameras. Mobile phones are accessories widely available, allowing be coupled, and so, they are very suitable for incorporation into portable microfluidic devices. Their rapid improvement of hardware and software, high-resolution cameras, processing power and worldwide coverage of wireless internet network connection can facilitate diagnostic access, permit continuous monitoring of health parameters and promote increased surveillance notifications. This way, it is possible to do geo-timed reports and tracking of data automated providing governments with statistical information for clinical and epidemiological impact evaluation and counter-measures policies implementation. In fact, 3D printers and smartphones are instruments that are revolutionizing the future of lab-on-chip platform [82].

Other innovative actuation principle is centrifugal microfluidic that taking advantage of the forces acting on liquids in rotating chips. A spindle motor is necessary to press the fluid in the microfluidic chip. The centrifugal systems are particularly important for tasks involving separation of particles in suspension, as even small differences in density between solid part and surrounding medium will result in sedimentation. It allows to perform the fluid manipulation within operational cartridges without the need of external micropumps and microvalves or previous sample preparation, as in the case to extract cell free plasma from whole blood [83]. Many challenges have been solved requiring only little of user interaction. These emergent microfluidic systems with integrated sensing, also termed lab-on-a-disc, are typically based on optical techniques, for example, absorbance, fluorescence or imaging. Optical readout with movable instrumentation are a successful detection and ensures several advantages: non-contact, high sensitivity, and the availability of optical components such as lasers and photo detectors or even constituents developed for optical disc drives [84].

2.5. Conclusions

Although great advances have been achieved in the development of PoCT immunosensors applied to health that facilitated the diagnosis of many diseases, control and handling more effectively, allowing analysis or multi-analysis more quickly, more remains to be done to make PoCT a practical devices for clinical routine. Carbon nanotubes, graphene metallic and magnetic nanoparticles nanostructures are examples of nanomaterials that have been widely used for electrochemical PoCTs, improving the amperometric transductions by promoting increase on the electron transfer and offer better electrocatalytic activity. Additionally, due to the large superficial area of nanomaterials, they are able result in increase on electroactive surface area, implying a high sensitivity for PoCTs. While many challenges still need to be overcome, the focus on PoCT immunosensor researches have grown exponentially on the last few decades. Many advantages make them ideal analytical methods: the phlebotomy step is avoided and replaced by a simpler and safer procedure; the collection of capillary blood with a few microliters can be performed on bedside; turnaround time of the diagnostic cycle is dramatically reduced and the results can be immediately informed to the patient, possibiliting the

decentralization of outpatient services; and also the coupling with technologies for mobile phones and similar devices is possible.

Acknowledgments

Authors thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Brazilian agency. Diego G. A. Cabral, Gilvânia M. de Santana, Paula A. B. Ferreira, Anne K. S. Silva, Erika K. G. Trindade, postgraduate students are grateful to FACEPE (Brazil) for their scholarships.

References

- [1]. E. C. Rama, A. Costa-García, Screen-printed Electrochemical Immunosensors for the Detection of Cancer and Cardiovascular Biomarkers, *Electroanalysis*, Vol. 28, Issue 8, Aug. 2016, pp. 1700-1715.
- [2]. C. Florkowski, A. Don-Wauchope, N. Gimenez, K. Rodriguez-Capote, J. Wils, A. Zemlin, Point-of-care testing (POCT) and evidence-based laboratory medicine (EBLM) – does it leverage any advantage in clinical decision making?, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, Vol. 54, Issue 7-8, November 2017, pp. 471-494.
- [3]. X. Fu, Z. Cheng, J. Yu, P. Choo, L. Chen, J. Choo, A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 78, 2016, pp. 530-537.
- [4]. K. M. Koczula, A. Gallotta, Lateral flow assays, *Essays Biochem.*, Vol. 60, Issue 1, 2016, pp. 111-120.
- [5]. M. Sajid, A. N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *J. Saudi Chem. Soc.*, Vol. 19, Issue 6, 2015, pp. 689-705.
- [6]. E. B. Bahadır, M. K. Sezgintürk, Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC – Trends Anal. Chem.*, Vol. 82, 2016, pp. 286-306.
- [7]. D. Quesada-González, A. Merkoçi, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 73, Nov. 2015, pp. 47-63.
- [8]. J.-H. Lee, *et al.*, Multiplex diagnosis of viral infectious diseases (AIDS, hepatitis C, and hepatitis A) based on point of care lateral flow assay using engineered proteinticles, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 69, July 2015, pp. 213-225.
- [9]. X. Gong, *et al.*, A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips, *J. Mater. Chem. B*, Vol. 5, Issue 26, July 2017, pp. 5079-5091.
- [10]. C. Kokkinos, A. Economou, M. I. Prodromidis, Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies, *Trends Anal. Chem.*, Vol. 79, May 2016, pp. 88-105.
- [11]. N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, F. Weis-Garcia, Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources, *ILAR J.*, Vol. 46, Issue 3, January 2005, pp. 258-268.
- [12]. R. A. S. Couto, J. L. F. C. Lima, M. B. Quinaz, Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis, *Talanta*, Vol. 146, January 2016, pp. 801-814.
- [13]. N. Gan, X. Du, Y. Cao, F. Hu, T. Li, Q. Jiang, An Ultrasensitive electrochemical immunosensor for HIV p24 based on Fe₃O₄@SiO₂ nanomagnetic probes and nanogold colloid-labeled enzyme-antibody copolymer as signal tag, *Materials (Basel)*, Vol. 6, Issue 4, March 2013, pp. 1255-1269.
- [14]. L. Suresh, P. K. Brahman, K. R. Reddy, J. S. Bondili, Development of an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles incorporated chitosan biopolymer nanocomposite film for the detection of prostate cancer using PSA as biomarker, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 112, May 2018, pp. 43-51.
- [15]. M. M. P. S. Neves, M. B. González-García, H. P. A. Nouws, A. Costa-García, Celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on nanohybrid screen-printed carbon electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 31, Issue 1, January 2012, pp. 95-100.
- [16]. B. V. M. Silva, B. A. G. Rodríguez, G. F. Sales, M. P. T. Sotomayor, R. F. Dutra, An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 77, 2016, pp. 978-985.
- [17]. Y. Xu, S. Yang, W. Shi, Fabrication of an immunosensor for cardiac troponin I determination, *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 12, Issue 9, 2017, pp. 7931-7940.
- [18]. A. Afkhami, P. Hashemi, H. Bagheri, J. Salimian, A. Ahmadi, T. Madrakian, Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype A using Au nanoparticles/graphene-chitosan composite, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 93, Jul. 2017, pp. 124-131.

- [19]. E. A. de Vasconcelos, N. G. Peres, C. O. Pereira, V. L. da Silva, E. F. da Silva, R. F. Dutra, Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 25, Issue 4, December 2009, pp. 870-876.
- [20]. Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013), *Microchim. Acta*, Vol. 181, Issue 9-10, July 2014, pp. 865-891.
- [21]. L. Syedmoradi, M. Daneshpour, M. Alvandipour, F. A. Gomez, H. Hajghassem, K. Omidfar, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 87, January 2017, pp. 373-387.
- [22]. M. Vidotti, R. Torresi, S. I. Córdoba De Torresi, Eletrodos modificados por hidróxido de níquel: Um estudo de revisão sobre suas propriedades estruturais e eletroquímicas visando suas aplicações em eletrocatalise, Eletrocromismo E baterias secundárias, *Quim. Nov.*, Vol. 33, Issue 10, 2010, pp. 2176-2186.
- [23]. Q. Huang, *et al.*, Nanotechnology-based strategies for early cancer diagnosis using circulating tumor cells as a liquid biopsy, *Nanotheranostics*, Vol. 2, Issue 1, 2018, pp. 21-41.
- [24]. Z. Farka, T. Juřík, D. Kovář, L. Trnková, P. Skládal, Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: Recent advances and challenges, *Chem. Rev.*, Vol. 117, Issue 15, August 2017, pp. 9973-10042.
- [25]. N. J. Wittenberg, C. L. Haynes, Using nanoparticles to push the limits of detection, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, Vol. 1, Issue 2, March 2009, pp. 237-254.
- [26]. K. S. Krishna, Y. Li, S. Li, C. S. S. R. Kumar, Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 65, Issue 11-12, November 2013, pp. 1470-1495.
- [27]. Z. Wang, Z. Dai, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: An overview, *Nanoscale*, Vol. 7, Issue 15, 2015, pp. 6420-6431.
- [28]. A. Ghasemi, *et al.*, Carbon nanotubes in microfluidic lab-on-a-chip technology: Current trends and future perspectives, *Microfluid. Nanofluidics*, Vol. 21, Issue 9, 2017, pp. 1-19.
- [29]. C.-M. Tîlmaciu, M. C. Morris, Carbon nanotube biosensors, *Front. Chem.*, Vol. 3, 2015, pp. 1-21.
- [30]. A. Dasgupta, L. P. Rajukumar, C. Rotella, Y. Lei, M. Terrones, Covalent three-dimensional networks of graphene and carbon nanotubes: Synthesis and environmental applications, *Nano Today*, Vol. 12, 2017, pp. 116-135.
- [31]. Z. Zhu, An overview of carbon nanotubes and graphene for biosensing applications, *Nano-Micro Lett.*, Vol. 9, Issue 3, 2017, pp. 1-24.
- [32]. J. Seo, *et al.*, Immunosensor employing stable, Solid 1-amino-2-naphthyl phosphate and ammonia-borane toward ultrasensitive and simple point-of-care testing, *ACS Sensors*, Vol. 2, Issue 8, 2017, pp. 1240-1246.
- [33]. A. C. M. S. Dias, S. L. R. Gomes-Filho, M. M. S. Silva, R. F. Dutra, A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 44, Issue 1, 2013, pp. 216-221.
- [34]. B. V. M. Silva, I. T. Cavalcanti, M. M. S. Silva, R. F. Dutra, A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T, *Talanta*, Vol. 117, 2013, pp. 431-437.
- [35]. E. Sánchez-Tirado, C. Salvo, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, F. Langa, J. M. Pingarrón, Electrochemical immunosensor for simultaneous determination of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in serum and saliva using dual screen printed electrodes modified with functionalized double-walled carbon nanotubes, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 959, 2017, pp. 66-73.
- [36]. 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.*, Vol. 109, 2013, pp. 10-15.
- [37]. S. Ma, *et al.*, Interaction processes of ciprofloxacin with graphene oxide and reduced graphene oxide in the presence of montmorillonite in simulated gastrointestinal fluids, *Sci. Rep.*, Vol. 7, Issue 1, 2017, pp. 1-11.
- [38]. R. Raccichini, A. Varzi, S. Passerini, B. Scrosati, The role of graphene for electrochemical energy storage, *Nat. Mater.*, Vol. 14, Issue 3, 2015, pp. 271-279.
- [39]. H. Sadegh, Development of graphene oxide from graphite: A review on synthesis, characterization and its application in wastewater treatment, *Rev. Adv. Mater. Sci.*, Vol. 49, 2017, pp. 38-43.
- [40]. L. G. Guex, *et al.*, Experimental review: Chemical reduction of graphene oxide (GO) to reduced graphene oxide (rGO) by aqueous chemistry, *Nanoscale*, Vol. 9, Issue 27, 2017, pp. 9562-9571.
- [41]. J. Yukird, T. Wongtangprasert, R. Rangkupan, O. Chailapakul, T. Pisitkun, N. Rodthongkum, Label-free immunosensor based on graphene/polyaniline nanocomposite for neutrophil gelatinase-associated lipocalin detection, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 87, 2017, pp. 249-255.
- [42]. P. K. Drain, *et al.*, Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings., *Lancet. Infect. Dis.*, Vol. 14, Issue 3, March 2014, pp. 239-249.
- [43]. B. V. M. Silva, B. A. G. Rodríguez, G. F. Sales, M. D. P. T. Sotomayor, R. F. Dutra, An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 77, 2016, pp. 978-985.

- [44]. S. X. Lee, H. N. Lim, I. Ibrahim, A. Jamil, A. Pandikumar, N. M. Huang, Horseradish peroxidase-labeled silver/reduced graphene oxide thin film-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 89, 2017, pp. 673-680.
- [45]. G. Doria, *et al.*, Noble metal nanoparticles for biosensing applications, *Sensors*, Vol. 12, Issue 12, Feb. 2012, pp. 1657-1687.
- [46]. Y. Li, H. J. Schluesener, S. Xu, Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bull.*, Vol. 43, Issue 1, March 2010, pp. 29-41.
- [47]. H. Malekzad, P. Sahandi Zangabad, H. Mirshekari, M. Karimi, M. R. Hamblin, Noble metal nanoparticles in biosensors: recent studies and applications, *Nanotechnol. Rev.*, Vol. 6, Issue 3, January 2017, pp. 301-329.
- [48]. M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: A review, *Front. Chem.*, Vol. 2, 2014, 63.
- [49]. N. Li, P. Zhao, D. Astruc, Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity, *Angew. Chemie Int. Ed.*, Vol. 53, Issue 7, February 2014, pp. 1756-1789.
- [50]. F. Inci, *et al.*, Multitarget, quantitative nanoplasmonic electrical field-enhanced resonating device (NE²RD) for diagnostics, *Proceedings of Natl. Acad. Sci.*, Vol. 112, Issue 32, August 2015, pp. E4354-E4363.
- [51]. S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 70, August 2015, pp. 498-503.
- [52]. M. Jacobs, A. Panneer Selvam, J. E. Craven, S. Prasad, Antibody-conjugated gold nanoparticle-based immunosensor for ultra-sensitive detection of troponin-T, *J. Lab. Autom.*, Vol. 19, Issue 6, Dec. 2014, pp. 546-554.
- [53]. 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*, Vol. 6, Issue 14, June 2014, pp. 5059-5066.
- [54]. R. El-Dessouky, M. Georges, H. M. E. Azzazy, Silver nanostructures: Properties, synthesis, and biosensor applications, *ACS Symposium Series*, Vol. 1112, 2012, pp. 359-404.
- [55]. X. Lu, M. Rycenga, S. E. Skrabalak, B. Wiley, Y. Xia, Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Vol. 60, 2009, pp. 167-192.
- [56]. Z. Farka, T. Juřík, D. Kovář, L. Trnková, P. Skládal, Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: Recent advances and challenges, *Chem. Rev.*, Vol. 117, Issue 15, August 2017, pp. 9973-10042.
- [57]. R. El-Dessouky, M. Georges, H. M. E. Azzazy, Silver nanostructures: Properties, synthesis, and biosensor applications, *ACS Symposium Series*, Vol. 1112, 2012, pp. 359-404.
- [58]. N. Hao, *et al.*, An electrochemical immunosensing method based on silver nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.*, Vol. 656, Issues 1-2, 2011, pp. 50-54.
- [59]. S. Felici, *et al.*, Towards a model of electrochemical immunosensor using silver nanoparticles, *Procedia Technol.*, Vol. 27, January 2017, pp. 155-156.
- [60]. X. Che, R. Yuan, Y. Chai, J. Li, Z. Song, J. Wang, Amperometric immunosensor for the determination of α -1-fetoprotein based on multiwalled carbon nanotube-silver nanoparticle composite, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 345, Issue 2, May 2010, pp. 174-180.
- [61]. Z. H. Ibupoto, N. Jamal, K. Khun, X. Liu, M. Willander, A potentiometric immunosensor based on silver nanoparticles decorated ZnO nanotubes, for the selective detection of d-dimer, *Sensors Actuators B Chem.*, Vol. 182, June 2013, pp. 104-111.
- [62]. J. B. Haun, T.-J. Yoon, H. Lee, R. Weissleder, Magnetic nanoparticle biosensors, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, Vol. 2, Issue 3, May 2010, pp. 291-304.
- [63]. J. B. Haun, T.-J. Yoon, H. Lee, R. Weissleder, Magnetic nanoparticle biosensors, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, Vol. 2, Issue 3, May 2010, pp. 291-304.
- [64]. L. Syedmoradi, M. Daneshpour, M. Alvandipour, F. A. Gomez, H. Hajghassem, K. Omidfar, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 87, January 2017, pp. 373-387.
- [65]. M. Martín, *et al.*, Rapid *Legionella pneumophila* determination based on a disposable core-shell Fe₃O₄@poly(dopamine) magnetic nanoparticles immunoplatfrom, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 887, August 2015, pp. 51-58.
- [66]. V. Singh, S. Krishnan, Voltammetric Immunosensor Assembled on carbon-pyrenyl nanostructures for clinical diagnosis of type of diabetes, *Anal. Chem.*, Vol. 87, Issue 5, March 2015, pp. 2648-2654.
- [67]. Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, W. Cai, Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials., *Curr. Mol. Med.*, Vol. 13, Issue 10, December 2013, pp. 1633-1645.
- [68]. S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 70, August 2015, pp. 498-503.

- [69]. M. Marie, S. Mandal, O. Manasreh, An electrochemical glucose sensor based on zinc oxide nanorods, *Sensors*, Vol. 15, Issue 12, July 2015, pp. 18714-18723.
- [70]. M. A. Seia, S. V. Pereira, M. A. Fernández-Baldo, I. E. De Vito, J. Raba, G. A. Messina, Zinc oxide nanoparticles based microfluidic immunosensor applied in congenital hypothyroidism screening, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 406, Issue 19, July 2014, pp. 4677-4684.
- [71]. A. T. Giannitsis, Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review, *Est. J. Eng.*, Vol. 17, Issue 2, 2011, pp. 109-139.
- [72]. Y. Temiz, R. D. Lovchik, G. V. Kaigala, E. Delamarche, Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?, *Microelectron. Eng.*, Vol. 132, January 2015, pp. 156-175.
- [73]. M. Zarei, Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 98, December 2017, pp. 494-506.
- [74]. P. K. Drain, *et al.*, Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings., *Lancet. Infect. Dis.*, Vol. 14, Issue 3, March 2014, pp. 239-249.
- [75]. F. A. Gomez, Paper microfluidics in bioanalysis, *Bioanalysis*, Vol. 6, Issue 21, November 2014, pp. 2911-2914.
- [76]. R. Amin, *et al.*, 3D-printed microfluidic devices, *Biofabrication*, Vol. 8, Issue 2, June 2016, 22001.
- [77]. J. Hu, *et al.*, Advances in paper-based point-of-care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 54, April 2014, pp. 585-597.
- [78]. C. M. B. Ho, S. H. Ng, K. H. H. Li, Y.-J. Yoon, 3D printed microfluidics for biological applications., *Lab Chip*, Vol. 15, Issue 18, 2015, pp. 3627-3637.
- [79]. K. Yamada, T. G. Henares, K. Suzuki, D. Citterio, Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices, *Angew. Chemie Int. Ed.*, Vol. 54, Issue 18, April 2015, pp. 5294-5310.
- [80]. R. Amin, *et al.*, 3D-printed microfluidic devices, *Biofabrication*, Vol. 8, Issue 2, Jun. 2016, 22001.
- [81]. J. Hu, *et al.*, Advances in paper-based point-of-care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 54, April 2014, pp. 585-597.
- [82]. M. Zarei, Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 98, December 2017, pp. 494-506.
- [83]. O. Strohmeier, *et al.*, Centrifugal microfluidic platforms: Advanced unit operations and applications, *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 44, Issue 17, August 2015, pp. 6187-6229.
- [84]. R. Burger, L. Amato, A. Boisen, Detection methods for centrifugal microfluidic platforms, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 76, February 2016, pp. 54-67.

Advances in Biosensors: Reviews Volume 2

Sergey Y. Yurish, Editor

The global biosensors industry is approaching towards multi-billion market. The modern biosensors market growth is driven by the continuous technological advancements in the biosensors ecosystem, increase in the use of biosensors for nonmedical applications, lucrative growth in point-of-care diagnostics, and rise in the demand for glucose monitoring systems. Increasing applications in diagnosis of various diseases and development of nanoparticle based electrochemical biosensors significantly stimulates growth of biosensors industry.

The second volume of 'Advances in Biosensors: Reviews', Book Series contains six chapters written by 24 authors from 7 countries: Brazil, China, Denmark, Japan, South Africa, Sweden and Ukraine.

I hope that readers will enjoy this new volume and that can be a valuable tool for those who are involved in research and development of different biosensors and biosensing systems.



ISBN 978-84-09-05393-3



9 788409 053933