



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

PAULA ANGÉLICA BURGOS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR SUPERCAPACITIVO PARA
DETECÇÃO DE CISTATINA C**

Recife
2019

PAULA ANGÉLICA BURGOS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR SUPERCAPACITIVO PARA
DETECÇÃO DE CISTATINA C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

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

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

F383d Ferreira, Paula Angélica Burgos.
Desenvolvimento de imunossensor supercapacitivo para detecção de Cistatina C /
Paula Angélica Burgos Ferreira. - 2019.
71 folhas, il., tab., abr. e sigl.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2019.

Inclui Referências.

1. Engenharia Biomédica. 2. Cistatina C. 3. Doença renal crônica.
4. Imunossensor. 5. Sensores interdigitados. 6. Beira-de-leito. 7. Nanocompósito.
I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orientadora). II. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-409

PAULA ANGÉLICA BURGOS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR SUPERCAPACITIVO PARA
DETECÇÃO DE CISTATINA C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovada em: 18/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ricardo Ataíde de Lima (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico esse trabalho a minha irmã Pollyanna cuja ajuda me fez conseguir.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Rosa Fireman Dutra, pela confiança e dedicação dispensada desde o início. Por todo o pique, conselhos e por tornar o processo dinâmico.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico (LAPED) pela disponibilidade, ajuda, descontração e por tornarem nossa segunda casa mais leve e feliz.

À Cecília e Thiago pela companhia e por me lembrarem que sou pequena quando até eu já tinha acreditado ser gigante.

À minha família por estar comigo nos momentos fáceis e difíceis. Por sempre torcer pela minha felicidade e vibrar com minhas conquistas.

Aos meus amigos, por me emprestarem os ouvidos e as sextas-feiras, quando a rotina cansava e o protocolo não tinha motivos para dar errado, mas dava.

À Prof.^a Janaína Rocha que, mesmo longe, acreditou em mim e me fez acreditar também.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE) pelo apoio financeiro.

À coordenação, professores e funcionários do PPGEB que contribuíram para a formação do meu caráter e conduta científica.

Por fim, e principalmente, ao meu Deus, o princípio de tudo, que me deu forças e ferramentas para superar cada surpresa do caminho, que arquitetou toda a jornada e escalou todas as personagens, por estar sempre ao meu lado.

RESUMO

A cistatina C (CysC) é um potente biomarcador para insuficiência renal crônica e renal aguda, além disso pode ser um indicativo de risco de sepse, e em níveis altos pode indicar pior prognóstico. Assim, o desenvolvimento de testes rápidos para a detecção e quantificação de CysC que permitam um método mais prático, rápido e econômico é desejável. Recentemente, os imunossensores eletroquímicos baseados em eletrodos interdigitados utilizando filmes condutores e nanomateriais foram abordados com sucesso para o desenvolvimento de testes à beira do leito. Isso se deve a possibilidade de desenvolver configurações de miniaturizadas e com maior sensibilidade em comparação com os eletrodos impressos em tela. Neste trabalho, os eletrodos de ouro interdigitados foram modificados por um filme de polipirrol-nanotubos de carbono obtido por eletropolimerização para formar um supercapacitor. As etapas do desenvolvimento do imunossensor foram acompanhadas por voltametrias cíclicas e pela espectroscopia da impedância eletroquímica (EIS). Os anticorpos anti-CysC foram imobilizados no filme nanoestruturado via etilenodiamina, seguido pelo bloqueio glicina em meio ácido e alcalino. As respostas analíticas foram obtidas por medidas de EIS por resistência à transferência de carga elétrica (RCT), de acordo com o modelo eletroquímico Randles-Sevick. Amostras de soro humano foram testadas e encontradas um LOD = $7,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ CysC, e intervalo linear de detecção entre 25 e 450 ng/mL. O ponto de corte foi calculado para ambas as amostras. Os sensores baseados em eletrodos interdigitados foram mostrados como dispositivos portáteis, sendo uma ferramenta potencial para ser útil em aplicações diagnósticas da CysC.

Palavras-chave: Cistatina C. Doença renal crônica. Imunossensor. Sensores interdigitados. Beira-de-leito. Nanocompósito.

ABSTRACT

Cystatin C (CysC) is a powerful biomarker for chronic renal and acute renal failure that can indicate sepsis risk, and a high level can indicate a worse prognostic. Thus, the development of rapid tests for the detection and quantification of CysC that permits a more practical, faster and economical method is desirable. Recently, electrochemical immunosensors based on interdigitated electrodes using conductive films and nanomaterials have been successfully addressed for development of point-of-care testing. This is due to the possibility of developing miniaturized configurations and with greater sensitivity compared to the printed screen electrodes. In this work, interdigitated gold electrodes were recovered by a carbon polypyrrole-nanotube film obtained by electropolymerization to form a supercapacitor. Immunosensor development steps were accomplished by cyclic voltammetries and electrical impedance spectroscopy (EIS). Anti-CysC antibodies were immobilized on the nanostructured film by ethylenediamine entrapment, followed by glycine blocking in acid and alkaline medium. Analytical responses were obtained by EIS measurements by electrical charge transfer resistance (RCT), according to Randles-Sevick electrochemical model. Serum and urine samples were tested, and it were found $LOD = 7,7\text{ng.mL}^{-1}$ CysC and linear range detection between 25 and 450 ng/mL. The cutoff was calculated for both samples. The sensors based on interdigitated electrodes were shown as portable devices, being a potential tool for useful in diagnostic applications that CysC allows.

Keywords: Cystatin C. Chronic renal disease. Immunosensor interdigitated. Point-of-care. Nanocomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Voltamograma básico	22
Figura 2 - Diagrama de Nyquist	23
Figura 3 - Circuito de Randles-Sevcik	24
Figura 4 - Eletrodos interdigitados.....	27
Figura 5 - Grafeno e nanotubos de carbono.....	29
Figura 6 - Movimentação de elétrons no polipirrol.....	30

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
C _{dl}	Capacitância de dupla camada, do inglês, “ <i>double layer capacitance</i> ”
CNT	Nanotubos de carbono, do inglês, “ <i>caborn nanotubes</i> ”
C _s	Capacitância específica, do inglês, “ <i>specific capacitance</i> ”
CV	Voltametria cíclica, do inglês, “ <i>cyclic voltammetry</i> ”
CysC	Cistatina C, do inglês, “ <i>cystatin C</i> ”
DRC	Doença Renal Crônica
EC	Capacitor eletroquímico, do inglês, “ <i>electrochemical capacitor</i> ”
E	Potencial
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês, “ <i>electrical impedance spectroscopy</i> ”
i	Corrente
IDE	Eletrodos interdigitados, do inglês, “ <i>interdigitated electrodes</i> ”
LOD	Limite de detecção, do inglês, “ <i>limit of detection</i> ”
PPy	Polipirrol, do inglês, “ <i>polypyrrole</i> ”
R _{ct}	Resistencia de transferência de carga, do inglês, “ <i>charge transfer resistance</i> ”
S	Siemens
SUS	Sistema Único De Saúde
TFG	Taxa de filtração glomerular
TRS	Terapia renal substitutiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	DOENÇA RENAL CRÔNICA	14
2.1	Marcadores DRC	15
2.1.1	<i>Cistatina C.....</i>	<i>18</i>
3	IMUNOSSENSORES	20
3.1	Imunossensores eletroquímicos	21
3.1.1	<i>Técnicas Eletroquímicas.....</i>	<i>21</i>
3.2	Estratégias de otimização.....	25
3.2.1	<i>Eletrodos interdigitados</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Nanocompósitos.....</i>	<i>28</i>
4	OBJETIVOS	32
4.1	Objetivos Específicos	32
5	ARTIGO - AN ULTRASENSITIVE IMMUNOSENSOR BASED ON PPY/CNT ELECTROCHEMICAL CAPACITOR ON THE INTERDIGITATED ELECTRODE FOR RENAL FAILURE BY CYSTATIN C DETECTION.	33
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a Doença Renal Crônica (DRC) acometa cerca de 12% da população mundial, com risco aumentado em países em desenvolvimento dada a dificuldade do acesso a serviços de saúde e diagnóstico (HILL et al., 2016b). Sua etiologia é múltipla e abrangente, os fatores de risco incluem senilidade, obesidade, doenças cardiovasculares e metabólicas, fatores genéticos, uso de substâncias nefrotóxicas, etc. As complicações podem ser evitadas se o diagnóstico de marcadores precoces for realizado (WEBSTER et al., 2017). A Cistatina C (CysC) vem se destacando por seu uso na avaliação da função renal, além de estudos correlacionando-a a sepse (POWELL et al., 2015) e como indicador de prognóstico clínico (LEELAHAVANICHKUL et al., 2014). Ao contrário da creatinina, marcador de primeira escolha, a elevação dos níveis plasmáticos da CysC é anterior a dos níveis da creatinina em lesões recentes. Além disso, a CysC não sofre influência de fatores como massa, altura, dieta, sexo ou idade do paciente (ONOPIUK; TOKARZEWICZ; GORODKIEWICZ, 2015a).

Uma vez que a DRC propende a se manifestar de maneira silenciosa, a detecção da CysC pode ajudar no diagnóstico precoce em serviços de triagem ou mesmo ser usada no monitoramento e estagiamento da doença. Atualmente, a dosagem de CysC é realizada através de testes convencionais laboratoriais imunoenzimáticos, sendo as mais utilizadas a imunonefelometria e imunoturbidimetria (ONOPIUK; TOKARZEWICZ; GORODKIEWICZ, 2015a). Entretanto, estas técnicas exigem um aporte físico específico, sendo realizadas apenas nos centros laboratoriais, o que pode dificultar o acesso do paciente ao serviço, resultando em retardo no diagnóstico. Os biossensores são dispositivos que empregam componentes biológicos associados a transdutores, sendo os sinais elétricos proporcionais às concentrações dos analitos, permitindo análises rápidas, com boa sensibilidade e especificidade, portanto apresentam possibilidade de análises quantitativas.

A associação de métodos de transdução eletroquímicos e reconhecimento através de anticorpos tem recebido destaque no desenvolvimento de biossensores. Estes, nomeados imunossensores, permitem que analitos em baixas concentrações sejam quantificados, contando com excelente especificidade da interação do

complexo antígeno (Ag)-anticorpo (Ag) (KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016). Além de seu bom desempenho, essa configuração permite que sejam desenvolvidos dispositivos do tipo point-of-care, arranjos portáteis de sistemas miniaturizados, mais facilmente (FELIX; ANGNES, 2018). No entanto, para a viabilização deste teste, algumas limitações técnicas precisam ser transpostas, como alterações eletroquímicas em baixíssima ordem, baixa sensibilidade, falhas na imobilização de biomoléculas, entre outras (SYEDMORADI et al., 2017).

Na tentativa de criar sistemas de alta capacitância específica os eletrodos interdigitados (IDEs) têm sido propostos. Estes consistem em eletrodos especiais formados por dois pentes feitos a partir de ouro evaporado, cujos dígitos não se tocam, mas são dispostos de forma alternada simulando pseudo-capacitores. Esta configuração permite perceber alterações na capacitância com maior sensibilidade. Além disso, podem ser empregados no desenvolvimento de sistemas *label-free*, cuja medição é feita diretamente a partir do acoplamento induzido do complexo antígeno-anticorpo, sem a necessidade de um cromógeno ou marcador.

Avanços nos estudos em nanotecnologia têm cooperado diretamente com o melhoramento de biossensores. O uso de filmes poliméricos, como o polipirrol combinados com nanomaterias tem sido testado para diferentes tipos de sensores. O polipirrol (PPy) permite o acúmulo de cargas o que lhe confere alta capacitância, além apresenta boa estabilidade propriedades mecânicas e fácil síntese (N.; MADHU; AWASTHI, 2011). Porém, quando se trata de baixos limites de detecção o uso isolado do PPy pode não ser satisfatório por isso, nanoestruturas têm sido empregadas nos filmes pois estes conferem maior área superficial/volume e aumento da taxa de transferência eletrônica e, conseqüentemente, do sinal gerado (XU et al., 2011). A associação de nanotubos de carbono (CNT) e PPy confere aos sensores aumento na capacitância específica, permite que haja interação através das ligações π - π entre os dois materiais, conferindo características de supercapacitores (AFZAL et al., 2017a). A síntese deste nanocompósito pode ser realizada por eletropolimerização em única etapa, o que, quando aplicado a IDEs, permite que o filme seja depositado apenas nas trilhas mantendo íntegra a geometria interdigitada e as características advindas dela.

Este trabalho trata-se do desenvolvimento de um imuno--sensor impedimétrico livre de marcação para detecção de CysC, com aplicações a sistemas *point-of-care* utilizando filme de polipirrol e CNT, sintetizado em uma única etapa sobre IDEs. As etapas do desenvolvimento e estudos prévios do sensor foram caracterizadas por voltametria cíclica. Já as dosagens de CysC foram obtidas pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica e ajustadas a um circuito elétrico equivalente para simulação dos componentes do circuito. A resistência de transferência de elétrons aumentou de acordo com o aumento na concentração de CysC do teste, mostrando correlação entre elas.

2 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Já em 2006, Salgado Filho e Brito atribuíram à doença renal crônica (DRC) o título de epidemia do milênio. Naquele ano, mais de 1 milhão de pessoas em Terapia Renal Substitutiva (TRS) no mundo foram contabilizadas. Desde então o número de portadores da doença tem tido aumento exponencial, estima-se que 12% da população mundial esteja em algum estágio da doença (HILL et al., 2016b). Segundo dados do último inquerido publicado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, a estimativa nacional de pacientes em diálise, tratamento do estágio mais avançado da DRC, corresponde a 122.825, mostrando que essa prevalência triplicou nos últimos 16 anos quando a estimativa era cerca de 42.000 pessoas (SESSO et al., 2017).

Além de um grave problema de saúde coletiva, a DRC também se tornou um peso aos cofres públicos, requerendo maiores investimentos em cuidados de assistência primária para pacientes com fatores de risco e tratamentos especializados para a grande quantidade de portadores (STEVENS et al., 2006). Pois, os pacientes podem desenvolver comorbidades (anemia, desnutrição, alterações metabólicas, acidose) decorrentes da perda das funções renais, necessitar de TRS, ou mesmo virem a óbito. O custo do tratamento anual de um paciente em TRS no SUS, responsável por cerca de 80% dos tratamentos no país, pode ultrapassar R\$ 30.000 e para paciente fora de TRS que necessitem de hospitalização R\$ 449,65 ("SIGTAP - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS", 2018).

DRC é um termo geral para lesão renal irreversível, de caráter estrutural e/ou funcional, persistente por mais de 3 meses e de origem inespecífica (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002). Dadas as múltiplas funções dos rins, como a produção e secreção de hormônios, excreção de substâncias potencialmente tóxicas ou resultantes do metabolismo corporal, controle do equilíbrio hidroeletrolítico, regulação da pressão arterial e metabolismo ácido-básico (GUYTON; HALL, 2013), seu perfeito funcionamento é primordial para manutenção da homeostase corporal. Na DRC, uma das principais funções afetadas é filtração de substâncias plasmáticas que acontece nos glomérulos, onde são reabsorvidas ou excretadas na urina, como ocorre com metabólitos resultantes e substâncias

tóxicas (THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2017). Apesar de não haver cura, existe uma série de cuidados que podem ser adotados a partir do momento do diagnóstico com fim de evitar a progressão e complicações advindas da doença (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010). É essencial para o tratamento e amparo à doença que logo ao ser diagnosticada seja realizado o estadiamento, identificada e controlada a causa e patologias coexistentes que possam agravar o quadro de saúde, e iniciado o tratamento renal específico (STEVENS et al., 2006).

A DRC não possui etiologia única, seu desenvolvimento pode se dar por origem genética, abuso de substâncias nefrotóxicas, hipertensão arterial, alimentação rica em sódio, deficiências causadas pela senilidade entre outras causas (BASTOS; OLIVEIRA; KIRSZTAJN, 2011). Uma vez que os estágios iniciais da DRC normalmente são assintomáticos, boa parte dos portadores apenas são diagnosticados quando a função renal já está seriamente comprometida. Por esse motivo, no atendimento à pacientes portadores dos principais fatores de risco, como hipertensão e diabetes, deve haver triagem afim de encaminhar os pacientes ao tratamento da DRC, quando detectada, e de modo a evitar possíveis decisões clínicas que possam agravar a lesão renal (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010; BASTOS; OLIVEIRA; KIRSZTAJN, 2011). Desse modo o ideal seria poder realizar o diagnóstico de maneira simples e rápida que permitisse a expansão do serviço de diagnóstico para as unidades de atendimento primário, para que as medidas de proteção sejam iniciadas (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

2.1 Marcadores DRC

Atualmente a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) é o melhor parâmetro para avaliar o déficit ou a perda função renal. Segundo as diretrizes internacionais (THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2017) a presença de TFG inferior a 60 mL/min $1,73 \text{ m}^2$ durante um período superior a 3 meses, institui DRC. Além do diagnóstico, a TFG tem papel muito importante no estadiamento da doença como é possível observar na tabela 1.

Tabela 1 - Estagiamento da DRC baseada na depuração de cistatina C.

Categorias TFG (ml/min/1,73 m ²). Descrição e alcance	G1	Normal ou alto	≥90
	G2	Levemente diminuída	60-89
	G3a	Levemente a moderadamente diminuída	45-59
	G3b	Moderadamente a gravemente diminuída	30-44
	G4	Gravemente diminuída	15-29
	G5	Insuficiência renal	<15

Fonte: KDIGO, 2017.

Para cada estágio é recomendado um tratamento específico, que inclui dieta, atividades físicas, modificações no estilo de vida, uso de medicações nefroprotetoras, ajuste na dosagem de outras medicações e controle de comorbidades (BRASIL, 2014). A aplicação correta desses tratamentos é de vital importância e pode evitar a progressão da doença. Porém, por deficiências no sistema de diagnóstico, grande parte dos pacientes com DRC são diagnosticados apenas nos estágios 4 e 5, onde a função renal já está severamente diminuída e a TRS, encarada pelos pacientes como um procedimento sofrido, doloroso e angustiante, se faz necessária (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). Durante a TRS os pacientes passam por uma rotina árdua, se veem privados em aspectos nutricionais, físicos e sociais, acarretando em grandes mudanças às suas condições de vida e frequentemente com impactos negativos à saúde mental (ALMEIDA; ALVES; SILVA, 2012; MOREIRA et al., 2014).

As substâncias usadas como marcadores da TFG podem ser de origem endógena ou exógena. As de origem própria apresentam procedimentos de mensuração menos complexos e de determinação mais rápida, tornando-as mais usuais na avaliação da TFG (BRAS, 2015). Gabriel, Nishida e Kirsztajn (2011), defendem para ser utilizado como marcador da TFG é necessário que a substância tenha livre filtração glomerular sem interferência tubular, ritmo de produção constante e não sofrer influência de outros fatores.

Usualmente, para fins de diagnóstico, a depuração da creatinina tem sido usada para determinação da TFG. Esta é um derivado da creatina muscular, de

massa molecular de 113 kDa, e por ser livremente filtrada pelos glomérulos, sua concentração sérica é inversamente proporcional à capacidade de filtração renal (STEVENSON et al., 2006). Para a dosagem, pode ser usada apenas a creatinina plasmática ou a medida de depuração, creatinina 24 horas. Embora esta possa fornecer informações mais precisas, o uso da creatinina sérica é recomendado, pois a de 24 horas depende da coleta de todo o volume de urina durante o período de um dia, procedimento bastante passível de erros, seja pela incompreensão do paciente ou pelo procedimento adotado (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Apesar de ainda ser habitualmente usada na avaliação da TFG, a concentração plasmática e depuração da creatinina podem sofrer interferência de diversos fatores, como interações medicamentosas, dietas proteicas, variação de massa muscular, idade e sexo. Mesmo havendo fórmulas para a correção o seu uso pode apresentar falhas diagnósticas (DHARNIDHARKA; KWON; STEVENSON, 2002).

A CysC tem sido mostrada como um marcador de função renal mais sensível que a creatinina, principalmente para os primeiros estágios, onde a TFG sofre poucas variações, pois seus níveis séricos sofrem maior variação que a creatinina nesse mesmo estágio (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011). Sua utilização já é recomendada pela National Kidney Foundation (2017), embora descarte completamente o uso da creatinina. Os valores de referência estão entre 0,74 - 0,10 mg/L e 0,65 - 0,085 mg/L para adultos do sexo masculino e feminino, respectivamente (OKAY, 2002).

A determinação da TFG através da CysC pode ser aplicada tanto ao diagnóstico quanto a classificação e monitoramento da evolução da doença (SHLIPAK et al., 2013; THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2017). Além de sua utilidade na DRC, a determinação da CysC também pode ser empregada no diagnóstico de insuficiência renal aguda e estudos têm sugerido eficiência e contribuições na classificação do risco de sepse e mortalidade em paciente internados (NEJAT et al., 2010).

2.1.1 Cistatina C

A CysC é uma proteína glicosilada de baixo peso molecular, cerca de 13.359 kDa, produzida nos lisossomos das células nucleadas do corpo humano e tem papel importante na inibição das proteinases cisteínicas. Possui ritmo de produção constante, ampla distribuição tissular e sua concentração sérica praticamente não tem influência de fatores como sexo, massa muscular entre outros. Essa proteína sofre livre filtração glomerular e após isso é reabsorvida pelas células tubulares em sua totalidade, onde é catabolizada completamente, assim, a elevação de seus níveis séricos pode ser considerada indicador de deficiência na filtração glomerular (DHARNIDHARKA; KWON; STEVENS, 2002; GARCÍA et al., 2011).

O primeiro método de detecção de CysC foi desenvolvido em 1979 tinha limite de detecção de 0,3 mg/L, baseado em imunodifusão radial (GARCÍA et al., 2011). Nesta técnica, anticorpos são incorporados em gel de agarose espalhado sobre uma superfície, a amostra é então depositada em poços e difundida pelo gel. Os antígenos presentes formam agregados com os anticorpos, o complexo gerado forma halos de precipitação. Através da medida do diâmetro deste anel formado pode-se estimar a concentração do analito na amostra. A difusão total da amostra e formação dos anéis pode levar até 72hs (MANCINI; CARBONARA; HEREMANS, 1965). Desde então os métodos vêm sendo refinados, atualmente os mais utilizados são as técnicas automatizadas de imunonefelometria e imunoturbidimetria (GARCÍA et al., 2011; ONOPIUK; TOKARZEWICZ; GORODKIEWICZ, 2015a). Ambas utilizam microesferas com anticorpos anti-CysC imobilizados que, após incubados com o soro do paciente, foram complexos com os antígenos da amostra. Estes complexos alteram a dispersão da luz, na nefelometria, e a absorbância, na turbidimetria, e essas medidas podem ser associadas à concentração da CysC (CHEW et al., 2008). Embora essas técnicas apresentem boa sensibilidade e acurácia, são testes realizados em múltiplas etapas e que requerem o transporte da amostra até um centro especializado, dificultando, muitas vezes, seu uso na triagem e monitoramento da função renal.

Predominantemente os casos de DRC terminal, onde o paciente precisa ser submetido TRS ou transplante, ocorrem em países em desenvolvimento, onde os

recursos são escassos e o acesso da população aos centros médicos especializados em diagnóstico é ímprobo tornando o diagnóstico precoce falho (BRASIL, 2014). Por isso o desenvolvimento de testes portáteis simples, rápidos, confiáveis e capazes de quantificar a CysC se faz necessário, tanto para o diagnóstico prévio da DRC quanto para o monitoramento clínico do paciente.

3 IMUNOSSENSORES

Comumente, testes de reconhecimento e dosagem empregados nas áreas de diagnóstico em saúde, controle ambiental e em indústrias de alimentação e purificação de água, são baseados em ligações antígeno-anticorpo para reconhecimento de analitos-alvo. Uma vez que anticorpos são moléculas produzidas *in vivo* a fim de reconhecer antígenos específicos, por meio dos epítomos, a formação de imunocomplexos (Ac-Ag) através de ligações não covalentes ocorridas a curta distância é de alta especificidade (GIL; KUBOTA, 1999). Este tipo de reconhecimento é altamente específico e, a depender da técnica ao qual for associado, pode identificar concentrações baixas, na ordem de μg ou mesmo ng .

Dentre os imunoensaios atuais, a utilização de imunossensores merece devido destaque. Estes, consistem em uma classe de biossensores que baseiam-se na formação do complexo Ac-Ag para reconhecimento e dosagem de moléculas, usando anticorpos ou antígenos imobilizados para a captura de seu complementar (FELIX; ANGNES, 2018). Para isso, são associados métodos de transdução de sinais, que permitem detectar, quantificar a ligação ocorrida e amplificar o sinal obtido, atribuindo ao teste alta sensibilidade (WEN et al., 2017). Tratando-se de diagnóstico clínico, o uso imunossensores frente a outros biossensores se distingue por não requerer amostras purificadas ou previamente tratadas (CALIL; SILVA, 2011).

Os imunoensaios tradicionais, de modo geral, são do tipo “sanduíche”, empregam um anticorpo imobilizado o qual, interage com um dado antígeno que por sua vez, liga-se a outro anticorpo marcado por um revelador e cuja leitura da reação se dá pela concentração do revelador restante ligado a esse “sanduíche”. Já os imunossensores podem optar pelo reconhecimento direto, sendo chamado de imunossensores *label-free*, isso representa avanços na velocidade do teste e simplificação das etapas envolvidas no processo de análise da amostra (YANG; LI; ERF, 2004). A designação *label-free* é dada quando o anticorpo, usado como elemento de captura, interage eletrostaticamente com um antígeno da amostra, por acoplamento induzido, e a partir desta ligação são detectadas alterações na interface eletrodo-solução, sem a necessidade do segundo anticorpo marcado (CHO et al., 2018). A fim de que as alterações resultantes na interação direta antígeno-

anticorpo sejam interpretadas, faz-se necessário o uso de uma técnica de transdução de sinal capaz de percebê-las.

3.1 Imunossensores eletroquímicos

Frequentemente, transdutores eletroquímicos têm sido combinados a imunossensores *label-free*, uma vez que através deles podem ser medidas as alterações no potencial e resistência da interface eletrodo-solução na superfície sensora ocorridas em consequência do acoplamento (DUTRA; KUBOTA, 2007). Os transdutores eletroquímicos são componentes capazes de converter sinais biológicos em medidas de propriedades elétricas. Podem ser potenciométricos, medindo variação de potencial; amperométricos, variação de corrente elétrica; impedimétricos, impedância da interação; ou capacitivos, responsáveis por medir a capacitância (ANDRADE, 2006; CALIL; SILVA, 2011). Dentre as vantagens do uso da transdução eletroquímica estão a facilidade de construção, rápida aquisição de sinais, além da estabilidade e baixo custo, quando comparado à outras técnicas como piezoelétricas e ópticas (WEN et al., 2017).

Os imunossensores eletroquímicos têm sido bem-sucedidos, dentre suas vantagens estão alta sensibilidade e seletividade, e necessidade de pequenas quantidades de amostras. Essa associação, imunossensores *label-free* e transdutores eletroquímicos, concede grande potencial de miniaturização ao dispositivo, sendo desenvolvido em formatos portáteis, podendo garantir a emancipação da estrutura do centro médico laboratorial, ainda contando com a precisão e acurácia dos testes convencionais (FELIX; ANGNES, 2018).

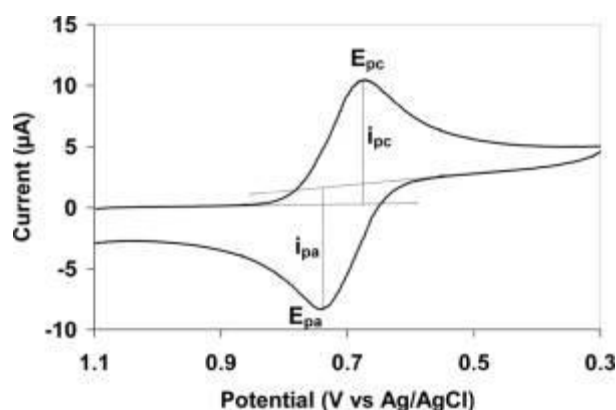
3.1.1 Técnicas Eletroquímicas

Dentre as técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica (CV) é uma das mais usadas. Seu uso está relacionado a questões de simplicidade, baixo custo instrumental e operacional, além da eficiência em fornecer informações sobre

processos adsorptivos, reações redox, e sobre a cinética de reações de transferência de elétrons (PACHECO et al., 2013).

Trata-se de uma técnica de avaliação dinâmica dos fenômenos ocorridos na interface entre a superfície de eletrodo de trabalho e a solução em contato direto com essa superfície. Para isso, a sequência de pulsos é aplicada ao sistema que em resposta gera uma corrente registrada em função de cada potencial aplicado, ou seja, $i = f(E)$, gerando um voltamograma (Figura 2) (HASSAN et al., 2015). A aplicação dos pulsos é feita como um processo de varredura e ocorre em dois sentidos, onde ao final do primeiro os potenciais programados são invertidos e a varredura segue até o vértex programado. Quando a varredura é realizada no sentido positivo para negativo ocorre a redução de um composto, quando para regiões positivas ocorre a oxidação do composto. Tanto na redução quanto na oxidação são gerados picos de corrente (E_{pc} e E_{pa} , respectivamente), no potencial onde o processo acontece (Figura 2). A amplitude da corrente gerada nesses picos pode ser correlacionada à disponibilidade do analito na interface eletrodo-solução, e por consequência na amostra, desde que o analito seja capaz de sofrer reações de oxirredução na janela potencial aplicada (PACHECO et al., 2013).

Figura 1 - Voltamograma básico



Fonte: WAHLSTRÖM (2014)

A técnica de CV, além de características de corrente, fornece informações para a determinação da capacitância específica de um material através da equação 1 (BO et al., 2014a),

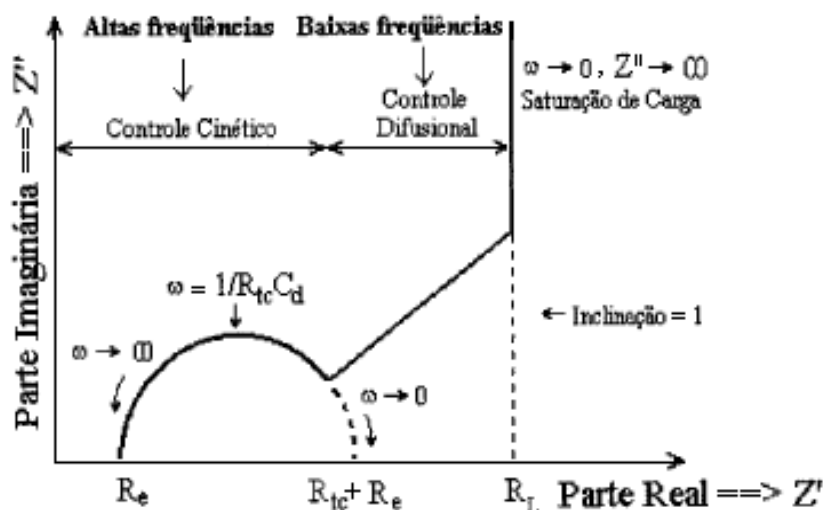
$$C_s = \frac{\int i dv}{vmV} \text{ (Equação 1)}$$

Onde C_s representa a capacitância específica, v a velocidade de varredura, V a janela de potencial e m a massa do material.

Essa técnica tem sido bastante empregada no ramo de sensores e biossensores. Ela pode ser usada no acompanhamento das etapas de desenvolvimento de sensores como realizado por Feng *et al.* (2016) que através da variação nos picos da corrente obtidos pelo CV em cada fase da montagem da plataforma sensora demonstrou a viabilidade desta; ou mesmo na obtenção da análise final do teste assim como já proposto para detecção de metronidazol (AMMAR *et al.*, 2016), glicose (SMITH *et al.*, 2018), paracetamol (GOYAL; GUPTA; CHATTERJEE, 2010), entre outros. Recentemente a necessidade de material com características de armazenamento de carga tem crescido em virtude das demandas industriais e tecnológicas, e em resposta a isso materiais de alta capacitância específica, supercapacitores, tem sido desenvolvidos (JAGADALE *et al.*, 2018).

Enquanto na voltametria potenciais são aplicados para obtenção de sinal em forma de corrente elétrica, na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) ocorre a aplicação de um estímulo elétrico, comumente uma tensão senoidal, para observação da resposta resultante: as partes reais e imaginárias em função da variação de frequências (Figura 3). As medidas obtidas no espectro relacionam-se tanto características inerentes ao material, como condutividade, geração e mobilidade de cargas e constante dielétrica; quanto a características da interface coma solução, como capacitância e coeficiente difusional (CHINAGLIA *et al.*, 2008).

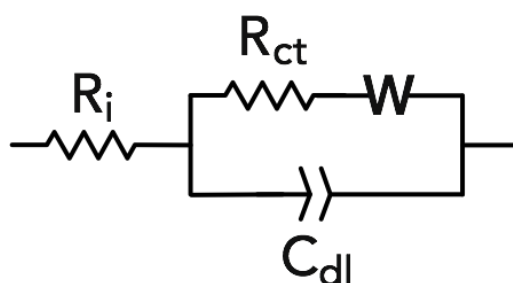
Figura 2 - Diagrama de Nyquist



Fonte: GIROTTTO e de PAOLI, (1999).

A fim de obter mais informações sobre as reações ocorridas, alguns modelos de ajuste, circuitos equivalentes, que simulam as propriedades e reações ocorridas na cela eletroquímica podem ser empregados. Para isso, é necessário compreender o comportamento do sistema de modo a escolher ou desenhar um circuito que melhor o represente (CHINAGLIA et al., 2008). O circuito de Randles-Sevcik (Figura 4) é bastante utilizado para ajustes de biossensores pois, ele associa a resultante da transferência eletrônica, corrente faradáica, ao componente capacitivo, através dele pode-se obter a resistência de transferência de cargas naquele sistema (DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006).

Figura 3 - Circuito de Randles-Sevcik



Fonte: LACEY (2017).

Apesar de ter teoria e aplicações complexas quando comparada a outros métodos eletroquímicos, a impedância é uma técnica de estado estacionário já bastante estabelecida. Esta fornece uma maiores detalhes sobre o comportamento geral das características elétricas ocorridas na interface eletrodo-solução fazendo possível estudar processo de cinética eletroquímica e o transporte de elétrons em semicondutores (DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006).

Sua aplicação no ramo de sensores representa ganhos de sensibilidade uma vez que pequenas variações passam a ser medidas. Essa técnica já foi empregada para detecção de IL-8 (SHARMA et al., 2016), microRNA (ZHANG et al., 2016) entre outros.

3.2 Estratégias de otimização

Apesar da combinação de captação por anticorpos e técnicas de transdução eletroquímicas ser bem-sucedida, o acoplamento induzido do complexo Ac-Ag gera sinais em pequena ordem. Para isso algumas estratégias para otimização de imunossensores eletroquímicos podem ser usadas, dentre elas, nas últimas décadas, destacam-se a utilização de eletrodos especiais e o incremento da plataforma sensora com materiais capazes de aumentar o sinal transduzido.

3.2.1 Eletrodos interdigitados

Sensores eletroquímicos podem fazer leituras usando sistemas de configurações variadas, sendo mais comum o trieletródico. Este faz uso de três eletrodos, o eletrodo de referência: que servirá de parâmetro ao sistema, isolado dos demais; contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar: de maior área superficial, que permite a migração de cargas ao 3º eletrodo; eletrodo de trabalho: onde ocorre a reação a ser medida (ANDRADE, 2006).

Os eletrodos de trabalho permitem que haja transferência eletrônica com o meio no qual o sistema está inserido, transferindo os sinais derivados da reação de biorreconhecimento até o transdutor. Estes podem ser desenvolvidos em diferentes formas, tamanhos e materiais quimicamente inerte, sendo os metais nobres, como ouro, os materiais de escolha, por sua excelente condutividade (CALIL; SILVA, 2011).

Durante muito tempo, eletrodos, hoje chamados convencionais, foram usados para pesquisa em biossensores. Estes são formados por um pequeno maciço de material condutor (ouro, prata, carbono, etc) unido a um contato elétrico, o conjunto é revestido com material isolante protetor de modo que apenas a superfície do condutor, fique exposta, garantindo a interface com o meio em uma extremidade e a ligação ao transdutor na outra.

Dada à escala e natureza nobre dos materiais envolvidos, os eletrodos convencionais têm um custo elevado, porém, após protocolos de limpeza e remoção

dos materiais aderidos, eles podem reutilizados. Por isso os eletrodos convencionais têm bastante aplicação em dispositivos de uso laboratorial e em pré-testes para desenvolvimento de sensores descartáveis, mesmo tendo um custo elevado. Com a necessidade de diagnósticos mais rápidos, que pudessem ser realizados em lugares remotos e distantes do centro de diagnóstico a tecnologia de fabricação de eletrodos tem sido aperfeiçoada e eletrodos mais baratos e com características de medição aprimoradas, terem sido desenvolvidos.

Os eletrodos impressos representam um grande passo nesse sentido. Estes contam com vantagens como uso de pequenos volumes de amostras, rápida análise, viabilidade para uso descartável, produção em grandes quantidades, confiabilidade e repetibilidade (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). Essas características associadas a métodos simples de análise, permitem que esses eletrodos sejam usados como “*tips*” sensoras atreladas a leitores portáteis com aplicação em diversas áreas, entre elas análises de substâncias, diagnóstico clínico e análises ambientais (LI et al., 2012).

O progresso da tecnologia de impressão em tela e de espalhamento de filme espesso permitiu produzir eletrodos impressos de excelente desempenho e fabricação em larga escala a um baixo custo. Em sua fabricação normalmente são empregadas tintas à base de carbono, ouro, prata, entre outras. As superfícies delas ou mesmo as próprias tintas podem ser modificadas por materiais que otimizem seu desempenho eletroquímico ou mesmo a fim de melhorar a estabilidade do eletrodo (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; LI et al., 2012).

Um eletrodo impresso pode abranger qualquer número de eletrodos, desde um único eletrodo que funcionará como eletrodo de trabalho, a um sistema trieletródico completo, com eletrodo de trabalho, auxiliar e referência, ou mesmo compreender um conjunto de eletrodos de trabalho realizado medições simultâneas (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). O seu formato, tamanho e configurações podem diferir. Algumas configurações apresentam vantagens específicas, os microeletrodos, por exemplo, quando comparados aos impressos comuns apresentam maior taxa de transferência de massa melhor relação sinal/ruído, menor queda ôhmica e baixos limites de detecção. Por isso, seu formato, configuração e tamanho e devem se planejados de acordo com os requisitos do analito alvo, o tipo da amostra e as demandas do sistema de análise (LI et al., 2012).

Estudos sobre o formato e configuração dos eletrodos impressos levaram ao desenvolvimento de uma configuração específica, os interdigitados (IDEs). Estes podem ser fabricados em substratos de silício ou outros materiais de elevada constante dielétrica consistindo de trilhas em metal (MAZLAN et al., 2017). O processo de fabricação das trilhas envolve técnicas de evaporação de metais ou fotolitografia, formando dois padrões interligados, porém sem contato entre eles (Figura 5). Cada um desses padrões possui igual quantidade de dígitos individuais sobrepostos aos do outro, aumentando a capacitância específica do eletrodo. Assim, quando uma tensão é aplicada, um campo elétrico é formado nos dígitos, e este pode sofrer alterações ou interrupções na presença de biomoléculas. Medidas destas alterações permitem que esses eletrodos sejam usados em biossensores eletroquímicos (MACKAY et al., 2015).

Figura 4 - Eletrodos interdigitados



Fonte: METROHM (2018)

O ouro tem sido o material de escolha para a produção de interdigitados com aplicação a biossensores por razões de biocompatibilidade, o material permite a aplicação de campos elétricos nas amostras testadas e a captação de sinais elétricos de detecção além de baixa resistência, alta relação sinal/ruído e rápida resposta (WANG et al., 2015).

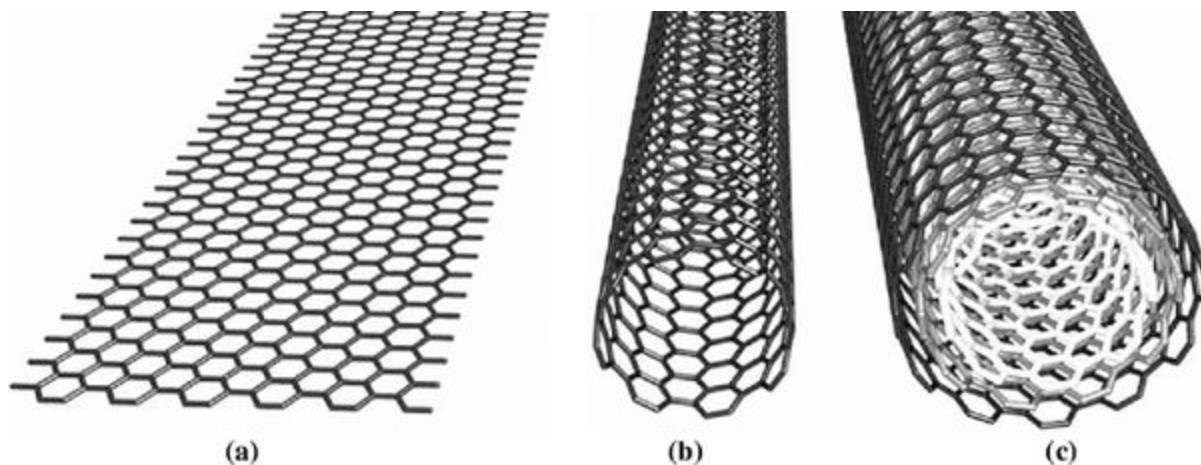
Para melhoramento dos sensores, a geometria do eletrodo e a escolha da técnica usada devem ser bem acertadas, pois podem influenciar diretamente no desempenho do teste. Frequentemente, a técnica de impedância tem sido aplicada a IDEs com fins de aumento de sensibilidade. Essa técnica permite que a

resistência gerada pela transferência de elétrons e a capacitância de dupla camada, sejam medidas em varredura de frequências, permitindo observar alterações de resistência de natureza complexa geradas em decorrência das ligações ocorridas na superfície do eletrodo (WANG et al., 2017). O campo elétrico gerado no eletrodo é a propriedade mais importante para a técnica de impedância, este sofre influência direta da geometria, dimensão e espaçamento dos dígitos (MACKAY et al., 2015). Além disso, IDEs em nanoescalas favorecem a sensibilidade do teste, já que eles “leem” apenas uma pequena região de cerca de 100 nm acima da superfície (VAN GERWEN et al., 1998).

3.2.2 Nanocompósitos

Para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos robustos, alguns obstáculos precisam ser transpostos, entre eles questões de compatibilidade com matrizes biológicas, transdução eficiente do evento de biorreconhecimento, e, aumento da sensibilidade. A síntese e disponibilidade de compostos nanométricos contribuiu para grandes avanços no ramo de sensores, uma vez que a aplicação de nanomateriais forneceu suporte para transpor barreiras anteriores (YANG et al., 2010).

Dentre os nanomateriais aplicados a sensores eletroquímicos, um dos mais utilizados são os Nanotubos de Carbono (CNT), bastante correlacionados à aumentos na condutividade e sensibilidade, além de apresentarem características como biocompatibilidade e estabilidade térmica e química. Os CNT que consistem em folhas de carbono enroladas, em cilindros, que podem ter uma ou mais “casas”, e, cujo comprimento pode variar de nanômetros a milímetros (Figura 6). Os carbonos dispostos em folha apresentam hibridização do tipo sp^2 , isto confere ao nanomaterial características semi-condutoras, variando a depender do alinhamento de seus orbitais, sendo por esta razão capazes de mediar a transferência de elétrons com rápida cinética (GUPTA; MURTHY; PRABHA, 2018). O uso de CNT em imunossensores já é bastante conhecido, sendo já tendo sido utilizado para detecção de fosfatase alcalina (SIMÃO et al., 2018), peptídeo natriurético tipo B (LI et al., 2018), cancro cítrico (HAJI-HASHEMI et al., 2018), dentre outras aplicações.

Figura 5 - Grafeno e nanotubos de carbono

Fonte: KREUPL *et al* (2004)

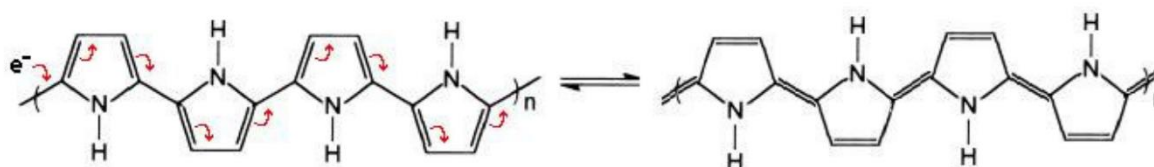
Os CNTs são facilmente funcionalizáveis e em virtude da sua grande área/volume pode-se usá-los para aumentar a superfície de contato do eletrodo com a solução, assim mais anticorpos podem ser imobilizados à superfície e estarem disponíveis para reconhecimento e por isso aumentando a sensibilidade do teste (JEON *et al.*, 2011). Comumente, imunossensores nanoestruturados usam nanotubos para ancoragem de anticorpos, assim como Rezaei *et al.* (2018) que através da química EDC/NHS ativou os grupos carboxílicos nos CNT previamente funcionalizados, de modo que estes ficassem predispostos a reagir com grupamentos aminas existentes nos anticorpos anti-Troponina, imobilizando-os por meio de ligações covalentes.

Uma outra vantagem dos CNT é a sua facilidade de fazer ligações $\pi - \pi$ com polímeros condutores a fim de amplificar o sinal obtido para o desenvolvimento de supercapacitores. Estes híbridos são chamados de nanocompósito, constituídos um composto formador de matriz no qual se dispersam nanoestruturas (AFZAL *et al.*, 2017a). Cientes das características únicas que cada material, polímeros condutores e nanomateriais, estudos de combinação entre eles para a formação de nanocompósitos têm sido desenvolvidos. Através destes foi percebido que a mesclagem entre eles provocar efeitos sinérgicos, originando compósitos mais estáveis e de propriedades ópticas, elétricas e magnéticas superiores às observadas no uso isolado dos materiais que os compõe (NASERI; FOTOUHI; EHSANI, 2018).

O polipirrol é um polímero orgânico, derivado do pirrol, um composto orgânico capaz de formar cadeias ou matrizes poliméricas que embora não tenham natureza propriamente condutora, dada sua estrutura molecular, quando em arranjos poliméricos passam a apresentar características de condutividade elétrica e acúmulo de cargas.

De modo geral, suas propriedades originam-se da conjugação de ligações duplas presentes em sua estrutura molecular (Figura 7). Assim, quando um elétron é injetado no sistema, as ligações alternadas permitem o livre movimento dele ao longo da cadeia (RAMANAČIUS; RAMANAČIENĖ; MALINAUSKAS, 2006). Além das vantagens do transporte de cargas o uso de filmes poliméricos aplicados às plataformas sensoras, pode ser respaldado por sua fácil síntese eletroquímica e facilitar a imobilização de biocomponentes na superfície eletródica, através de ligações covalentes.

Figura 6 - Movimentação de elétrons no polipirrol



Fonte: ANDRADE (2006)

Filmes de polipirrol têm sido bastante utilizados para desenvolvimento de biossensores. Características como atividades catalítica e redox, capacidade de formação de cadeias como condutividade na ordem de 10^{-4} a 10^{-2} S.cm⁻¹, capacidade de adsorver moléculas biológicas, controle da espessura do filme e funcionalização em única etapa, por variadas técnicas eletroquímicas, fazem do polipirrol uma escolha comum dentre os filmes usados em sensores eletroquímicos (RAMANAČIUS; RAMANAČIENĖ; MALINAUSKAS, 2006).

Tratando-se de imunossensores, o polipirrol pode também formar um complexo com os anticorpos, através de ligações covalentes entre eles, o processo de adsorção/dessorção gera a transferência de cargas capazes de migrar pela matriz polimérica e até a interface com a superfície do eletrodo onde ocorre a difusão de íons (GOODING et al., 2004).

Graças à estrutura porosa do filme de polipirrol é possível incorporar nanoestruturas ao sistema de maneira íntima, envolvendo-as e facilitando sua manipulação. O elemento formador da matriz é determinante para as características do compósito. Por sua vez os nanotubos, dada a sua relação área superficial/volume, podem dispersar-se na matriz, e quanto mais uniformemente distribuídos melhores são as propriedades atribuídas ao nanocompósito (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

Além da distribuição das partículas, o processo de síntese do compósito pode influenciar diretamente no desempenho deste, pois a boa adesão entre os dois componentes permite que a transferência de carga ocorra de maneira facilitada entre eles. A síntese de nanocompósitos à base de PPy pode ser realizada através da mistura dos componentes e da polimerização ou síntese de nanomateriais *in situ*. Processos de polimerização *in situ* são simples, podendo ser desenvolvidos em única etapa, garantem maior controle molecular sobre o processo, distribuição homogênea, melhor adesão à superfície eletródica, baixo custo de produção, e por isso tem sido amplamente empregados (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014).

4 OBJETIVOS

Desenvolver plataforma sensora nanoestruturada à base de anticorpos anti-Cistatina C sobre IDEs, com aplicação para testes rápidos.

4.1 Objetivos Específicos

- Estudar a formação filmes de nanocompósito de PPy/CNT e otimizar os parâmetros eletroquímicos favorecendo características de acúmulo de carga e aumento da capacitância específica do sistema.
- Avaliar a imobilização de anticorpos anti-CysC no filme através de processos químicos-adsortivos.
- Caracterizar as etapas de imobilização por técnicas eletroquímicas.
- Avaliar a viabilidade de resposta da plataforma sensora com amostras enriquecidas com proteína CysC e levantar as suas curvas de resposta.

5 ARTIGO - AN ULTRASENSITIVE IMMUNOSENSOR BASED ON PPY/CNT ELECTROCHEMICAL CAPACITOR ON THE INTERDIGITATED ELECTRODE FOR RENAL FAILURE BY CYSTATIN C DETECTION.

Paula A. B. Ferreira¹, Maria C. M. de Araujo¹, Cecília M. Prado¹, Ricardo A. de Lima², Blanca A.G. Rodrigues¹, *Rosa F. Dutra¹.

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

² Electrical Engineering Department, Pernambuco State University, Recife, Brazil

Corresponding author:

Prof. Rosa Fireman Dutra

Email: rosa.dutra@ufpe.br

Phone/Fax: +55 81 21267325

Abstract

An interdigitated immunosensor for Cystatin C detection based on polypyrrole/carbon nanotube electrochemical capacitor is described. Cystatin C (CysC) is powerful biomarker for early acute renal failure and one predictive for cardiovascular risk, sepsis, cancer and death. Recently, electrochemical immunosensors based on interdigitated electrodes (IDE) have been successfully focused on development of point-of-care testing, due to their miniaturization facilities and higher sensitivity as compared with the screen-printed electrochemical sensing. Herein, a polypyrrole/carbon nanotube nanohybrid film was grafted on two gold fingers by electropolymerization obtaining a supercapacitor. Anti-CysC antibodies were immobilized on the IDE by covalent entrapment via ethylenediamine bifunctional agent, followed by glycine blocking in acid and alkaline medium. Under low frequency, capacitive effect of antigen-antibody interaction were observed by double layer capacitance, and analytical responses of this IDE immunosensor to CysC serum were obtained by changes on phase angle a linear range up to 300 ng/mL. The cutoff was calculated for serum samples showing a total reducing of non-specific binding at approximately 28 ng/mL CysC. This immunosensor based on interdigitated electrode (IDE) is a potential tools as portable device, with possibility to use as a practical and rapid test for CysC diagnostic in samples of serum.

Keywords: Cystatin C; Nanosensor; Interdigitated electrode; Electrochemical capacitor; Polypyrrole.

1. Introduction

Kidney diseases affects more than 12% of the world population and are considered a serious public health problem that can lead to renal substitutive therapy or kidney failure, resulting in a strong impact on the patient's quality of life and death (HILL et al., 2016a; THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2017). Recently, Cystatin C (CysC) has gained attention being considered as a powerful early biomarker of acute kidney injury characterized by rapid decline in glomerular filtration rate (MURTY et al., 2013; ONOPIUK; TOKARZEWICZ; GORODKIEWICZ, 2015b). The serum levels of CysC can be correlated to the presence and degree of renal injury, with the advantage to be less affected by gender, age, muscle mass and also does not suffer delayed in acute failure, and others (DSA et al., 2017; SHLIPAK et al., 2013). Recent studies have reported the CysC also as biomarker for risk of cardiac attack (SALGADO; SOUZA; SALGADO, 2013; VAN DER LAAN et al., 2016), neurological disorders (MATHEWS; LEVY, 2016), cancer (LETO; CRESCIMANNO; FLANDINA, 2018; ZI; XU, 2018), risk of death (SHLIPAK et al., 2005, 2013) and sepsis (NEJAT et al., 2010). Thus, monitoring of CysC helps in making important therapeutic decisions, being mandatory the development of practical and rapid tests.

Currently, the dosage of cystatin C is performed by enzyme immunoassays (ONOPIUK; TOKARZEWICZ; GORODKIEWICZ, 2015b), nephelometry, turbidimetry (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994) and other more sophisticated methods, such as by electrospray chromatography (JI et al., 2017). However, these techniques require skilled personals, sophisticated equipment and are commonly processed in a central laboratory, which can hamper patient access or may delay the patient management (GOPINATH et al., 2014). Point-of-care testings represent a good alternative for CysC, and some lateral flow testings were developed in this sense (www.scurvescientific.co.uk), however, low sensitivity and limitations regarding the quantifying are main drawbacks. In this sense, immunosensors can be a good strategy due to attending all these demands and, can be offered at a lower cost.

Recently, impedance immunosensor based on interdigitated electrode (IDE) has shown as one of attractive analytical possibilities for point-of-care testings with good sensitivity and reproducibility (MAZLAN et al., 2017; MIHAILESCU et al., 2015), presenting these advantages, especially as compared with screen-printed electrode technologies (TROJANOWICZ, 2016). Interdigitated array microelectrode or simply interdigitated electrode (IDE) consists of two interconnected, but non-

contacting combs, obtained by evaporating the metal in a piezoelectric substrate (WANG et al., 2015). When the IDE is excited by an electrical frequency, specific interactions between antigen-antibodies are detected by oscillations in the electromagnetic field generated by perturbations on the electrode surface (Fig. 1(a)). The impedance of biomolecule interactions (Z_{Biom}) measured on the IDE immunosensor depends on the Faradaic and non-Faradaic processes occurred at the electrode surfaces. Z_{Biom} depends on the double layer processes, the electrode-electrolyte interface capacitance and resistance between the electrodes on the medium conductivity (GUIMERA et al., 2015). An illustrative model of electrical circuit derived is showed in Fig. 1 (b). In Faradaic process, the perturbations are resulting in charges (e.g., electrons) transferred across the metal-solution interface that are measured by Resistance of charge transfer (R_{CT}). Under some conditions, no charge transfer reactions occur, however processes such as adsorptions and desorptions can occur modifying the electric surface potential, that result in a differential capacitance with relation to the surface charge. This differential capacitance, denoted as C_{DL} is the capacitance of double layer. In the IDE immunosensor, Z_{Biom} is dependent on the C_{DL} and the Capacitance of dielectric (C_{DE}). When the frequency is high enough, the current passes through C_{DE} instead of R_{CT} (ZOU et al., 2007). However, it well-established that biomolecular interactions are better observed at low frequencies (MIHAILESCU et al., 2015), and in this case, the Z_{Biom} does not depend on the C_{DE} (MAZLAN et al., 2017).

.....Please Insert Fig.1.....

One of first works using capacitive immunosensor based on non-faradaic impedance was performed in a planar device with electrodes formed by two strips evaporated on a silicon oxide substrate, allowing label-free detection of cardiac troponin T in concentrations between 0.1 and 5 ng/mL, measuring the direct capacitance (DE VASCONCELOS et al., 2009). In the capacitive immunosensor developments, electrode surfaces are usually covered with an additional insulating layer to reduce Faradaic currents (Mihailescu et al., 2015). Recently, 3D capacitor electrodes with a high charge storage capacity by containing more material loading in the third dimension have gained great attention for non-Faradaic sensor applications (HU et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Electrochemical capacitors (EC)

can be produced by combining different materials and grafted on the IDE surface electrodes, resulting in the 3D electrochemical capacitor to feasible more sensitive immunosensors. EC is one of the most promising energy storage technologies offered by green chemistry and it has challenged the crescent demand required by portable/mobile electronics, electrical vehicles, biosensors, etc. (ELESSAWY et al., 2019). The fundamental mechanism for higher energy storage of EC is first, derivated from the electrostatic accumulation of charge in the electrical double layer, and due to the enlargement of surface area; therefore charge storage takes place at the electrode/electrolyte interface. The second mechanism is based on reversible redox reactions occurring on electrode materials (Lota et al., 2015).

Interest in the EC based on the conducting polymer-carbon hybrid nanomaterials have been intensified due to they possess new or improved physicochemical properties, resulting from the synergism of organic and inorganic components that interact at the molecular level level (TKACHENKO et al., 2018). They can form a three-dimensional conducting grid, increasing the surface area and allow an abundance of reaction sites with the possibility of large charge storage and mechanical stability (HOEFER; BANDARU, 2009; VALENTINI et al., 2013; YESI et al., 2016). Conductive organic polymers, such as polypyrrole (PPy) and their derivatives have been employed due to aggregate a high conductivity, storage ability, and doping/dedoping rates, besides its biocompatibility (Li and Zhitomirsky, 2013). (Afzal et al., 2017; Mahore et al., 2014). The microstructural uniformity achieved by the CNT integrations to the PPy is derived from strong π - π bonds between PPy conjugated structure and the CNT sidewall graphitic (FANG; XU; WANG, 2018). Without CNTs, intercalation-deintercalation of anions leads to a change in the polymer volume, reducing the long term stability of PPy and diminished charge propagation and the capacitance. Consequently, the cycle-life of PPy is poor compared with PPy carbon-based supercapacitors (LOTA et al., 2015b). In synthesis, EC of PPy/CNT nanohybrid compound has the advantage of ensuring better reproducibility, simpler synthesis and controlled thickness (XU et al., 2011). PPy/CNT can be in situ grafted to electrode surfaces forming EC by means of the oxidation of aromatic compounds, being readily electrosynthesized from a range of aqueous and non-aqueous solvents (SABOURAUD et al., 2000; STEJSKAL; TRCHOVÁ, 2018). In this study, a capacitive IDE immunosensor based on a PPy/CNT nanohybrid compound was developed for detection of cystatin C, allowing future applications to a point-of-care diagnostic of renal failure.

2. Material and Methods

2.1 Reagents

CysC, monoclonal antibodies anti-CysC, pyrrole (98%), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and ethylenediamine (EDA) 98% were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA). Amine multi-walled carbon nanotube (CNT) was acquired from Dropsens®. Glycine was purchased at Fluka Analytical® (Charlotte, Carolina do Norte, EUA). H_2SO_4 and, potassium ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) were obtained from Vetec® (São Paulo-Brasil). The potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) from Modern Chemistry®.

The Phosphate-buffered saline (PBS) (0,01 M, pH 7,4) used at all steps was prepared by the dissolution of 0,2 g of KCl, 8,0 g of NaCl, 0,24 g of KH_2PO_4 and 1,44 g of Na_2HPO_4 , in 1000 mL of pure water; and the citrate buffer solution was prepared by the dissolution of (pH 5,5) 1 g of $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ and 0,34 g of $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ in 100 mL of pure water. All water used was obtained from a RO180 (Biohuman®) reverse osmosis unit. All other reagents not described and used in the experimental assays were of analytical grade.

2.2. Cys human serum samples

A pool of sera used in all experiments was reached from 10 serum samples, which were obtained from venous blood collected in plastic SST Vacutainer® type (serum separation tube) and centrifuged for 15 min at 6000 RPM/s. Afterwards, the pool positive serum was spiked with a desirable concentration of CysC biomarker diluted in PBS. A control pool was processed using the same protocol; excepting CysC spiked step; the samples were filled with same PBS volume.

2.3. Apparatus and measurements

Electrochemical characterization, synthesis of nanocomposite (PPy/CNT) and impedimetric measurements were performed by using a conventional three-electrode system comprised of the IDE as working electrode, helical platinum wire as an auxiliary electrode and the Ag/AgCl 3M KCl electrode as reference. The electrodes

were connected to a potentiostat/galvanostat PGSTAT204 Autolab (Eco Chemie, The Netherlands), with impedance module connected to the PC computer system and controlled by software Nova 2.1.3. The IDE's pads were jumped by electrical contact for two combs and connected to potentiostat, as well two other electrodes, that were immersed in a compact home-made cell (1mL).

Cyclic voltammetry (CV) assays for electrochemical characterizations were carried out at 0.05 mV/s scan rate, with a potential window of -0.2 to 0.6 V Cl in presence of 5mM $K_3 [Fe(CN)_6]$ / $K_4 [Fe (CN)_6]$ prepared in 0.1M KCl redox probe. Electrosynthesis of PPy/CNT nanocomposite was performed by chronoamperometry technique at 0.8V for 35s, and impedimetric measurements were obtained changing the electrical by electric impedance spectroscopy (EIS) from 70 kHz to 0.1Hz with peak amplitude 100 mV, with potential formal of 0.224V, with a home-made electrochemical cell inside in a Faraday's cage. The impedimetric measurements were registered in presence of 0.005 M $K_3 [Fe(CN)_6]$ / $K_4 [Fe (CN)_6]$ prepared in 0.1M KCl redox probe. All experiments these mentioned experiments were conducted at room temperature (24 ± 1.5 ° C).

Scanning Electronic Microscopy (SEM) was performed by using a FEI Quanta 200 FEG microscope (Eindhoven, NLD). All SEM analyses were performed using 20 kV acceleration voltages in low-vacuum mode. Atomic Force Microscopy (AFM) in the non-contact mode was also performed to evaluate the roughness increase by nanocomposite on the IDE surface. Then, the images were acquired from the Nanosurf Flex AFM (Liestal, Switzerland) equipped with a C3000 controller using a TAP190AI-G tip. The images obtained were treated and analyzed by Gwyddion (version 2.49).

2.4. Fabrication of interdigitated electrode

The IDEs consisted of two symmetrically arranged combs, each containing 50 digits, 10 μ m width (w) and 10 μ m spacing between the digits of the different pairs (g) (Fig. 1(b)). They were obtained by lithography technique, in which the gold film was deposited on the silicon wafer by e-beam *evaporation* (~ 60 nm thickness) using chromium to improve the adhesion of the film. These devices were fabricated in a clean room (class 1000), located in the National Nanotechnology Laboratory of the National Energy and Materials Research, Campinas, Brazil.

2.5. Preparation of the PPy/CNT nanocomposite

Prior to PPy/CNT nanocomposite obtaining, the surface of the IDE was cleaned by applying a continuous jet of pure water during 120 seconds. The IDEs were air-dried by a jet pump and inspected in an optical magnifying glass to identify possible gaps in the trails or defects of connection in the combs by discarding them. PPy/CNT nanocomposite synthesis was formed by one-step electropolymerization using chronoamperometry technique by applying a potential of 0.8 V during 35s. The electrochemical cell was filled by 4.75 mL mixture [1:9], containing 1.5 mg/mL of CNT previously dispersed in dimethylformamide (DMF) and 0.1 M H₂SO₄ aqueous solution, and finally added 0.21 mL of pyrrole monomer solution to mixture and homogenized.

2.6. Immobilization of the Anti-CysC and immunoassay

Initially, a solution of 5 µl of EDC (40 mM), 5 µl of NHS (100 mM) and 5 µl of Anti-CysC (20 µg/ml) were prepared in a microtube Eppendorf® and left to react at room temperature for 30 min. After, 5 µl of EDA (20%) were added to this solution, and allowed to react for another 30 min. Afterwards, the obtained solution was deposited in modified PPy/CNT IDE and incubated for 2 hours at room temperature. Subsequently, the electrode was exhaustively washed and subjected to two steps of blocking by glycine solution, one in acid medium (pH 5,0) and another in alkaline medium (pH 8,0), incubating each for 40 minutes. The glycine blocking agent in acid medium was prepared in 0.1 M citrate buffer (PH 5.5) and alkaline medium, in 10 mM PBS (PH 8.0). Finally, the IDE was four time by washed PBS (pH 7.4) before measurements. To analytical measurements obtaining, the anti-CysC electrode was incubated for 30 minutes in a moist chamber at room temperature, with a volume of 8 µl of sample, which was sufficient volume for filling of all area of the fingers. After incubation, the IDEs were subjected to two PBS washes, in order to remove non-specific bindings and non-reagent material. A brief scheme of all preparation steps is shown in **Fig. 2**.

.....Please Insert Fig.2.....

3. Results and Discussions

3.1 Synthesis of the PPy/CNT electrochemical capacitor

Due to several factors affecting the performance of EC, two electrochemical techniques by grafting the PPy/CNT were used, chronoamperometry (0.8V) and the cyclic voltammetry (30 cycles, with the potential window between -0.2 and + 1.2 V, and scan rate at 50 mV/s). In both techniques, the polymerization was successful done indicating an increase of the electroactive area and charge storage (**Fig. S1**). Nevertheless, it was observed that the redox peaks ($\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$) by CVs that were more clearly defined using the chronoamperometry technique (**Fig. S1 (a)**), when compared with those obtained by cyclic voltammetry (**Fig. S1 (b)**).

Although, the mechanism of conduction in PPy has not yet well-established, the most widely accepted view of conductivity, in these systems involves transport along the polymer chains, as well as hopping of carriers. This charge transport is derived by the fact that it is a semiconductor with a full valence band and an empty conduction band (STEJSKAL; TRCHOVÁ, 2018). Reduction-oxidation processes in the PPy conducting polymers involves mass and resistance changes, as well as electron transitions. Thus, polymeric film implies on increase of charge storage, with direct impacts on the capacitance (SAJID; MAHMOOD; AYUB, 2018). Here, specific capacitance (C_s) of PPy film was calculated based on electroactive area of the CV, according to equation 3;

$$C_s = \frac{\int i.dV}{v.m.V} \quad \text{Equation 3;}$$

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 in **Fig. 3 (a)**, the C_s value was found at 25 F/g, that is similar to other studies involving organic electrolytes of PPy (BO et al., 2014b). Incorporation of the CNT to PPy film has yielded electrodes with superior electrochemical performance, and also allowed composites with higher conductivity and increase of charge storage (Frackowiak et al., 2006). It is hypothesized that the CNT increase the capacity to store charge resulting in both an increase in pseudo-capacitance and specific capacitance (AFZAL et al., 2017b). Here, when the pseudo-

capacitance of the electrode obtained from the CVs (**Fig. 3**), after modification with PPy/CNT (Curve I), was compared to that with only the PPy film (Curve II), it was observed an increase in the double-current (I_{dl}) of 23% higher in this PPy/CNT film. A number of reports have described an increase in specific capacitance of PPy due to CNT added to the composite (SCHNOOR et al., 2013). EC behavior was confirmed by increase on electroactive area, indicating a high capacity of charge storage added to pseudo-capacitance improved by CNTs incorporations to the nanocomposite. According to Equation 3, the specific capacitance was 15 F/g, higher than the PPy electrochemical capacitance, attributed by CNTs present on structure, which results in a larger surface area and increase of double layer capacitance (AFZAL et al., 2017b). Lota et al., (2015b) achieved a specific capacitance of 50 F/g, using ex-situ PPy/CNT synthesis. In this work, one-step, *in situ* electrosynthesis permitted to preserve the dielectric capacitance, since the PPy is not formed on the dielectric, only the on the gold fingers.

.....Please Insert Fig.3.....

Electrochemical behavior of PPy/CNT nanocomposite film submitted to CVs at different scan rates was similar to PPy (**Fig S1**), in which cathodic and anodic current peaks obtained were linear with square root of scan rates, indicating that redox reactions of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ on the electrodes was a diffusion-controlled process (**Fig. 4 (a)**). Redox peaks of PPy/CNT IDE were also stable ($\text{CV} < 5$), meaning a good electrochemical stability. Homogeneity and distributions of the nanohybrid formed on each combos was studied. Electrochemical measurements were carried out by connecting one comb each time to potentiostat, to performe the CV measurements. The specific capacitance calculated showed values practically similars for left and right combs, means that the PPy/CNT electrosynthesis process was well-conducted (**Fig. 4(b)**).

.....Please Insert Fig.4.....

SEM images of IDE surface showed the presence of the PPy/CNT film adhered only to the gold surface, as seen in microphotography of bare IDE comparing to and PPy/CNT modified electrode, confirming successful *in-situ* electrosynthesis, (**Fig 5 (a) and (b)**). Discrete undulations viewed in SEM images produced by PPy/CNT seem to represent a discrete non-homogeneity, that is viewed by the increase in rugosity. AFM images also showed a roughness increased approximately 130%, as compared with blank IDE, as shown in the exploded view of Fig. (a) and (b).

.....Please Insert Fig5.....

3.2. Immobilization of anti-CysC

Antibody immobilization techniques on the sensing surface are one of the most important steps in the construction of an immunosensor, with relation to their performance (DUTRA et al., 2007). Among the antibody immobilization methods, covalent bond has been highly preferred because the molecules are not leached out during the analyses, guaranteeing a greater reproducibility in the measurements. Herein, the strategy used the anti-CysC cross-linked by ethylenediamine (EDA) entrapment, through Fc portion via amide bonds for better antigen interactions (BANIUKIEWICZ et al., 2012). This covalent amide bond was established by use of the EDC/NHS chemistry (GORODKIEWICZ; LUSZCZYN, 2011). AntiCysC immobilization on the PPy/CNT film was electrochemically confirmed by CVs, through a decrease of redox peaks as compared with the PPy/CNT modified electrode (**Fig. S3**). Similarly, the glycine blockage step was confirmed by slightly decrease on the redox peaks, avoiding the non-specific bindings (TRINDADE; DUTRA, 2018). The optimal anti-CysC antibody concentrations immobilized was also evaluated, obtaining an optimal antigen-antibody interaction charge at 5 µg/mL (Fig. Sup 4).

3.2. Immunosensor response to the CysC serum samples

The developed IDE immunosensor was evaluated with 5 µl CysC spiked and non-spiked serum samples incubated at room temperature (24 °C) for 20 min in a moist chamber, using EIS that was taken with peak amplitude at 50 mV and

frequency range from 20 Hz to 1 MHz. Considering that adsorptions and desorptions processes occurred on the electrode surface are better observed by non-Faradaic processes, it is expected that changes on electrical impedance due to the capacitive or inductive effects can be observed by shifting on the phase angles. It was observed an increase in the phase angle amplitude with increase of CysC concentrations (**Fig.6(a)**). As mentioned by previous reports (MIHAILESCU et al., 2015; ZOU et al., 2007), at low frequencies the antigen-antibody interactions on the electrode surface are more evidenced, and changes due to the C_{DE} can be desprezed. Here, these particular frequency (f) were obtained around 1.4 KHz. It was also confirmed by Nyquist diagram through the peak corresponding to the maximum of the impedance imaginary part (Z'') in response to the blank (**Fig. S4**), in this point, the capacitance is maximal, e.g. the phenomenon is mainly due to the double-layer capacitance. Analytical curve was obtained by difference of the phase angle measured in each CysC concentration subtracted from the blank (glycine modified-anti-CysC IDE). This immunosensor showed a linear range up to 300 ng/mL CysC and $R^2 = 0.987$ ($n=7$), with limit of detection (LOD) found at 24 ng/mL ($LOD = 3\sigma/\text{slope}$ according to IUPAC) (**Fig. 6(b)**). Additionally, this immunosensor was able to distinguish with good specificity the CysC in complex samples studied (spiked and non-spiked serum), performing at 10 replicates serum samples, with a cutoff established at 28 ng/mL as shown in **Fig. 6(c)**. It means that below this value, interferences commonly found in real serum samples, like the studied samples, such as proteins, metabolites and other compounds can lead to false positive detections. Consequently, this CysC IDE immunosensor presented a good selectivity and sensitivity for real samples, with values of CysC measured in a range of clinical relevance for the management of renal failure patients (FINNEY; NEWMAN; PRICE, 2000; SHLIPAK et al., 2013). On the other hand, it is possible also to state that the sensor has also a selective behavior, with minimal effect of nonspecific bindings. This success on the specificity can be attributed to the double blocking steps that were carried out with the glycine, in both, acidic and basic medium, allowing glycine to attachment as by an amine, as well by a carboxyl moiety, therefore, being more efficient.

Comparing this electrochemical capacitive IDE immunosensor with previous biosensors for CysC detection, it present some advantages; first by recognizing the analyte using an antibody, instead papain as receptor (Desai et al., 2018; Gorodkiewicz and Luszczyn, 2011; Lin et al., 2013; Mi et al., 2016), allowing to

detect the CysC in any samples, without restrictions where antibodies can be present due to the fragment Fab moieties. Second, regarding to the amperometric sensors, this approach is more practical and faster, since it does not require further reading stages, such as the introduction of labels (Yang et al., 2016; Desai et al., 2018). Finally, amperometric transduction is simpler, and easier for miniaturization, being interesting as point-of-care testing, as compared with optical transductions (GORODKIEWICZ; LUSZCZYN, 2011; LIN et al., 2013; MI et al., 2016; TAO; ZHAO; ZENG, 2016). Thus, to our best knowledge, there are no immunosensors for CysC similar to the one here developed.

4. Conclusions

A immunosensor based on a PPy/CNT supercapacitor grafted on the IDE electrode, with large charge storage capacity and high surface area reached was developed to CysC detection. Linear range and LOD achieved allows this use in clinical range and cutoff is relevant for use in renal failures. Moreover, this immunosensor has potential for applying to the point-of-care immunoassays, helping detection of biomolecule with the high diagnostic sensitivity e specificity. The efficient blocking agent using by glycine in two different mediums (alkaline and acid) shows as good strategy to maximal minimize the non-specific bindings. As results, this immunosensor has advantages of low cost and portability, label free detection with good sensitivity.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq Brazilian agency under grants number 471065/2014-5, 440605/2016-4 and 407905/2013-8. We also acknowledge Dr. Angelo Luis Gobbi from Brazilian Nanotechnology National Laboratory /CNPEM, Campinas, Brazil for his notable technical support in this work. P.A.B. Ferreira and M.C.M Araújo thank the FACEPE agency from their scholarships.

References

- AFZAL, A. et al. Polypyrrole/carbon nanotube supercapacitors: Technological advances and challenges. **Journal of Power Sources**, v. 352, p. 174–186, jun. 2017a.
- AFZAL, A. et al. Polypyrrole/carbon nanotube supercapacitors: Technological

advances and challenges. **Journal of Power Sources**, v. 352, p. 174–186, jun. 2017b.

ALMEIDA, ANTÔNIO BONIFÁCIO DA; ALVES, VERONICA DE FÁTIMA; SILVA, SANDRO CAETANO DA. Qualidade de Vida do Paciente Renal Crônico em Hemodiálise. **Revista de Iniciação Científica da Libertas**, v. 2, n. 1, p. 83–93, 2012.

AMMAR, H. B. et al. Boron doped diamond sensor for sensitive determination of metronidazole: Mechanistic and analytical study by cyclic voltammetry and square wave voltammetry. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 604–610, 1 fev. 2016.

ANDRADE, V. M. DE. **Confecção de Biossensores através da Imobilização de Biocomponentes por Eletropolimerização de Pirrol** Poroto Alegria, 2006.

BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 2341–2353, 2014.

BANIUKEVIC, J. et al. Comparison of Oriented and Random Antibody Immobilization Techniques on the Efficiency of Immunosensor. **Procedia Engineering**, v. 47, p. 837–840, 2012.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 248–253, 2010.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'órgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BASTOS, M. G.; OLIVEIRA, D. C. Q.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica no paciente idoso. **Revista HCPA**, v. 31, p. 52–65, 2011.

BO, Z. et al. Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications. **Scientific Reports**, v. : 4684, n. 4, p. 1–8, 2014a.

BO, Z. et al. Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications. **Scientific Reports**, v. : 4684, n. 4, p. 1–8, 2014b.

BRAS, C. D. H. **Desafios Da Trs No Brasil Doença Renal Crônica** : 2015.

BRASIL. Diretrizes Clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica no Sistema Único de Saúde. **Ministério Da Saúde**, n. 1, p. 1–37, 2014.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA. Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, p. 1–20, 2011.

CHEW, J. S. C. et al. Cystatin C--a paradigm of evidence based laboratory medicine. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 29, n. 2, p. 47–62, maio 2008.

CHINAGLIA, D. L. et al. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino.

Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 30, n. 4, p. 4504.1-4504.9, 2008.

CHO, I.-H. et al. Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification. **Sensors**, v. 18, n. 1, p. 207, 12 jan. 2018.

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.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA APLICADA AO ESTUDO DAS REAÇÕES HETEROGÊNEAS EM ÂNODOS DIMENSIONALMENTE ESTÁVEIS. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

DE VASCONCELOS, E. A. et al. Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 870–876, 15 dez. 2009.

DESAI, D. et al. Ultrasensitive sensor for detection of early stage chronic kidney disease in human. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, n. January, p. 90–94, 2018.

DHARNIDHARKA, V. R.; KWON, C.; STEVENS, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 2, p. 221–226, 1 ago. 2002.

DSA, J. et al. Association Between Serum Cystatin C and Creatinine in Chronic Kidney Disease Subjects Attending a Tertiary Health Care Centre. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 11, n. 4, p. BC09-BC12, abr. 2017.

DUTRA, R. F. et al. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, 2007.

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. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, n. 1–2, p. 114–120, fev. 2007.

ELESSAWY, N. A. et al. Development of High-Performance Supercapacitor based on a Novel Controllable Green Synthesis for 3D Nitrogen Doped Graphene. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1129, dez. 2019.

ESTEVEZ, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. NANOCOMPÓSITOS DE MATRIZ POLIMÉRICA: ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE DE MATERIAIS HÍBRIDOS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 798–806, 2004.

FANG, Y.; XU, L.; WANG, M. High-Throughput Preparation of Silk Fibroin Nanofibers by Modified Bubble-Electrospinning. **Nanomaterials**, v. 8, n. 7, p. 471, jun. 2018.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors. A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470–478, 15 abr. 2018.

FENG, X. et al. Ratiometric biosensor array for multiplexed detection of microRNAs based on electrochemiluminescence coupled with cyclic voltammetry. **Biosensors**

and Bioelectronics, v. 75, p. 308–314, 15 jan. 2016.

FILHO, N. S.; BRITO, D. J. D. A. Doença renal crônica: a grande epidemia deste milênio. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. XXVIII, n. Supl. 2, p. 1–5, 2006.

FINNEY, H.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 49–59, jan. 2000.

FRACKOWIAK, E. et al. Supercapacitors based on conducting polymers/nanotubes composites. **Journal of Power Sources**, v. 153, n. 2, p. 413–418, fev. 2006.

GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 2, p. 261–267, jun. 2011.

GARCÍA, M. F. et al. Cistatina C en la evaluación de la función renal. **Revista del Laboratorio Clínico**, v. 4, n. 1, p. 50–62, 2011.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T. ALGUNS ASPECTOS DE IMUNOENSAIOS APLICADOS À QUÍMICA ANALÍTICA. v. 22, n. 6, 1999.

GOODING, J. J. et al. Electrochemical modulation of antigen-antibody binding. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 2, p. 260–268, 2004.

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

GORODKIEWICZ, E.; LUSZCZYN, J. Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) Sensor for Cystatin Determination Based on Immobilized Papain. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 1, p. 23–29, 2011.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, n. 1, p. 252–258, 6 ago. 2010.

GUIMERÀ, A. et al. Effect of surface conductivity on the sensitivity of interdigitated impedimetric sensors and their design considerations. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 207, n. PB, p. 1010–1018, 2015.

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, 2018.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. [s.l: s.n.]. v. 53

HAJI-HASHEMI, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 275, n. August, p. 61–68, 2018.

HASSAN, K. et al. CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS QUANTO AO USO DA VOLTAMETRIA DE VARREDURA ESCALONADA EM PROCESSOS ADSORTIVOS. **Quim. Nova**, v. 38, n. 3, p. 431–435, 2015.

HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. p. 1–18, 2016a.

HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158765, 6 jul. 2016b.

HOEFER, M.; BANDARU, P. R. Determination and enhancement of the capacitance contributions in carbon nanotube based electrode systems. 2009.

HU, C.-F. et al. Development of 3D carbon nanotube interdigitated finger electrodes on polymer substrate for flexible capacitive sensor application. **Nanotechnology**, v. 24, n. 44, p. 444006, nov. 2013.

JAGADALE, S. D. et al. Functionalized crown ether assisted morphological tuning of CuO nanosheets for electrochemical supercapacitors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 816, p. 99–106, 1 maio 2018.

JEON, I.-Y. et al. Functionalization of Carbon Nanotubes. In: YELLAMPALLI, S. (Ed.). **Carbon Nanotubes – Polymer Nanocomposites**. S. I.: IntechOpen, 2011. p. 91–110.

JI, H. et al. Quantification of cystatin-C in human serum by stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1059, p. 49–55, ago. 2017.

JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 1, p. 1–3, 2004.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 1 maio 2016.

KYHSE-ANDERSEN, J. et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 10, p. 1921–6, out. 1994.

LEELAHAVANICHKUL, A. et al. Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 307, n. 8, p. F939–F948, 15 out. 2014.

LETO, G.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C. On the role of cystatin C in cancer progression. **Life Sciences**, v. 202, p. 152–160, 1 jun. 2018.

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, 2012.

LI, X. et al. Dual mode competitive electrochemical immunoassay for B-type natriuretic peptide based on GS/SnO₂/polyaniline-Au and ZnCo₂O₄/N-CNTs. **Biosensors and Bioelectronics**, 2018.

LIN, H. et al. Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 256–261, 2013.

LOTA, K. et al. Carbon / polypyrrole composites for electrochemical capacitors.

Synthetic Metals, v. 203, p. 44–48, 2015a.

LOTA, K. et al. Carbon/polypyrrole composites for electrochemical capacitors. **Synthetic Metals**, v. 203, p. 44–48, maio 2015b.

MACKAY, S. et al. **Simulating electrical properties of interdigitated electrode designs for impedance-based biosensing applications**. 2015 IEEE 28th Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering (CCECE). **Anais...IEEE**, 2015Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/7129305/>>

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235–IN6, 1 set. 1965.

MATHEWS, P. M.; LEVY, E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 32, p. 38–50, 1 dez. 2016.

MAZLAN, N. S. et al. Interdigitated electrodes as impedance and capacitance biosensors: A review. **AIP Conference Proceedings**, v. 1885, 2017.

MI, L. et al. A novel photoelectrochemical immunosensor by integration of nanobody and TiO₂ nanotubes for sensitive detection of serum cystatin C. **Analytica Chimica Acta**, v. 902, p. 107–114, 1 jan. 2016.

MIHAILESCU, C.-M. et al. A Sensitive capacitive immunosensor for direct detection of human heart fatty acid-binding protein (h-FABP). **Talanta**, v. 132, p. 37–43, jan. 2015.

MOREIRA, J. M. et al. Neuropsychiatric disorders and renal diseases: an update. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 3, p. 396–400, 2014.

MURTY, M. S. N. et al. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury. **Indian journal of nephrology**, v. 23, n. 3, p. 180–3, maio 2013.

N., R.; MADHU; AWASTHI, R. Polypyrrole Composites: Electrochemical Synthesis, Characterizations and Applications. In: **Electropolymerization**. [s.l: s.n.]. p. 131–157.

NASERI, M.; FOTOUHI, L.; EHSANI, A. Recent Progress in the Development of Conducting Polymer-Based Nanocomposites for Electrochemical Biosensors Applications : A Mini-Review. **Chem. Rec**, v. 18, p. 599–618, 2018.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Am J Kidney Dis**, v. 39, p. S1–S266, 2002.

NEJAT, M. et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 14, n. 3, p. R85, 2010.

OKAY, T. S. Cistatina C: um novo marcador de função renal em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 112–113, jun. 2002.

ONOPIUK, A.; TOKARZEWICZ, A.; GORODKIEWICZ, E. Cystatin C: A Kidney Function Biomarker. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 68, p. 57–69, 1 jan.

2015a.

ONOPIUK, A.; TOKARZEWICZ, A.; GORODKIEWICZ, E. Cystatin C: A Kidney Function Biomarker. In: **Advances in Clinical Chemistry**. [S. l.] Elsevier, 2015b. v. 68p. 57–69.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

POWELL, T. C. et al. Cystatin C and long term risk of community-acquired sepsis: a population-based cohort study. **BMC Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 61, 23 dez. 2015.

RAMANAVIČIUS, A.; RAMANAVIČIENĖ, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 27, p. 6025–6037, 25 ago. 2006.

REZAEI, B. et al. An electrochemical immunosensor for cardiac Troponin I using electrospun carboxylated multi-walled carbon nanotube-whiskered nanofibres. **Talanta**, v. 182, n. January, p. 178–186, 2018.

SABOURAUD, G. et al. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283–293, 1 jan. 2000.

SAJID, H.; MAHMOOD, T.; AYUB, K. High sensitivity of polypyrrole sensor for uric acid over urea, acetamide and sulfonamide: A density functional theory study. **Synthetic Metals**, v. 235, p. 49–60, 1 jan. 2018.

SALGADO, J. V.; SOUZA, F. L.; SALGADO, B. J. How to understand the association between cystatin C levels and cardiovascular disease: Imbalance, counterbalance, or consequence? **Journal of Cardiology**, v. 62, n. 6, p. 331–335, 1 dez. 2013.

SCHNOOR, T. I. W. et al. The production of aligned MWCNT/polypyrrole composite films. **Carbon**, v. 60, p. 229–235, ago. 2013.

SESSO, R. C. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. 2017.

SHARMA, R. et al. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 607–613, 15 jun. 2016.

SHLIPAK, M. G. et al. Cystatin C and the Risk of Death and Cardiovascular Events among Elderly Persons. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 20, p. 2049–2060, 19 maio 2005.

SHLIPAK, M. G. et al. Cystatin C versus Creatinine in Determining Risk Based on Kidney Function. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 10, p. 932–943, 5 set. 2013.

SIGTAP - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS. Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/procedimento/exibir/0305020056/02/2018>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured electrochemical immunosensor for detection of serological alkaline phosphatase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, n. July, p. 413–418, 2018.

SMITH, S. K. et al. Quantitative Comparison of Enzyme Immobilization Strategies for Glucose Biosensing in Real-Time Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry Coupled with Carbon-Fiber Microelectrodes. **ChemPhysChem**, v. 19, n. 10, p. 1197–1204, 22 maio 2018.

STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M. **Conducting polypyrrole nanotubes: a review**. [S. l.] Springer International Publishing, 2018.

STEVENS, L. A. et al. Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 23, p. 2473–2483, 8 jun. 2006.

SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: The impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 373–387, 15 jan. 2017.

TAO, J.; ZHAO, P.; ZENG, Q. The determination of cystatin C in serum based on label-free and near-infrared light emitted PbS@BSA QDs. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 4, p. 4258–4262, 2016.

THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **About Chronic Kidney Disease**. Disponível em: <<https://www.kidney.org/atoz/content/about-chronic-kidney-disease>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

TKACHENKO, L. I. et al. One-Step Synthesis of the Polyaniline–Single-Walled Carbon Tubes Nanocomposite in Formic Acid and Its Electrochemical Properties. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, v. 54, n. 4, p. 617–623, jul. 2018.

TRINDADE, E. K. G.; DUTRA, R. F. A label-free and reagentless immunoelectrode for antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 272–279, dez. 2018.

TROJANOWICZ, M. Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2016.

VALENTINI, F. et al. Single Walled Carbon Nanotubes/polypyrrole-GOx composite films to modify gold microelectrodes for glucose biosensors: Study of the extended linearity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, n. 1, p. 75–78, 2013.

VAN DER LAAN, S. W. et al. Cystatin C and Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 9, p. 934–45, 2016.

VAN GERWEN, P. et al. Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 49, n. 1–2, p. 73–80, 1998.

WANG, L. et al. A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 646–653, 2017.

WANG, R. et al. A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of E. coli O157:H7. **Biosensors**, v. 5, n. 4, p. 791–803, 2015.

WEBSTER, A. C. et al. Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, 25 mar. 2017.

WEN, W. et al. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 138–156, 3 jan. 2017.

XU, Y. et al. Configuration and capacitance properties of polypyrrole/aligned carbon nanotubes synthesized by electropolymerization. v. 56, p. 3823–3828, 2011.

YANG, L.; LI, Y.; ERF, G. F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1107–1113, 2004.

YANG, W. et al. Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 12, p. 2114–2138, 2010.

YANG, Z. H. et al. Highly Effective Protein Converting Strategy for Ultrasensitive Electrochemical Assay of Cystatin C. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5189–5196, 2016.

YESI, Y. et al. Directly-Grown Hierarchical Carbon Nanotube@Polypyrrole Core-Shell Hybrid for High-Performance Flexible Supercapacitors. **ChemSusChem**, v. 9, n. 4, p. 370–378, 2016.

ZHANG, J. et al. An immobilization-free electrochemical impedance biosensor based on duplex-specific nuclease assisted target recycling for amplified detection of microRNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 452–457, 15 jan. 2016.

ZHAO, C. et al. Three dimensional (3D) printed electrodes for interdigitated supercapacitors. **Electrochemistry Communications**, v. 41, p. 20–23, abr. 2014.

ZI, M.; XU, Y. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. **Immunology Letters**, v. 196, p. 80–90, 1 abr. 2018.

ZOU, Z. et al. Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 136, n. 2, p. 518–526, maio 2007.

Figures and Captions

Captions

Fig. 1. IDE immunosensor: (a) Schematic design illustrating the principles of working; (b) Electrical circuit model.

Fig. 2. Schematic design of stepwise modification on the surface of the IDE immunosensor

Fig. 3. a) Illustrative plot of specific capacitance from IDE; Error bars represent the standard deviation of three replicate measurements. b) CVs obtained in: I) Bare and (II) PPy and (III) PPy/CNT. All measurements were performed in presence of 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ prepared in 0.1M KCl, at 50 mV/s scan rate

Fig. 4 (a) CVs of modified IDEs with PPy/CNT film obtained in presence of 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ prepared in 0.1M KC, in different scan rates (10, 20,30, 40, 50, 60, 70,80, 90, 100,110,120, 130,140,150 mV/s), and (b) Current peaks linear adjusted in function of the square root scan rate (square R = 0.99935 and 0.99966 for cathodic and anodic peaks, respectively) (c) Typical CVs obtained from combs and (d) Representative bar plot of the specific capacitance in respective combs.

Fig 5. Images of the bare and PPy/CNT IDE surfaces by (a) SEM, and exploded view with AFM micrography.

Fig 6. (a) Phase Angle responses of the IDE immunosensor submitted to samples of CysC spiked serum (50 to 300 ng/mL) (b) Linear adjusted curve obtained of the phase angle in different analytical responses c) Box plot of positive and negative CysC spiked serum.

Fig. 1

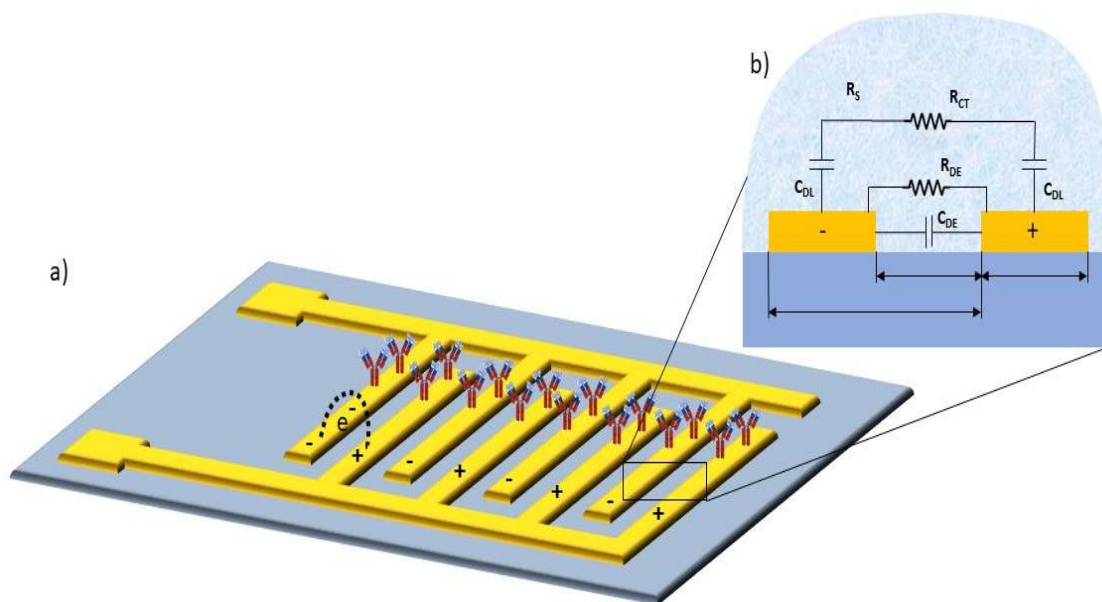


Fig. 2

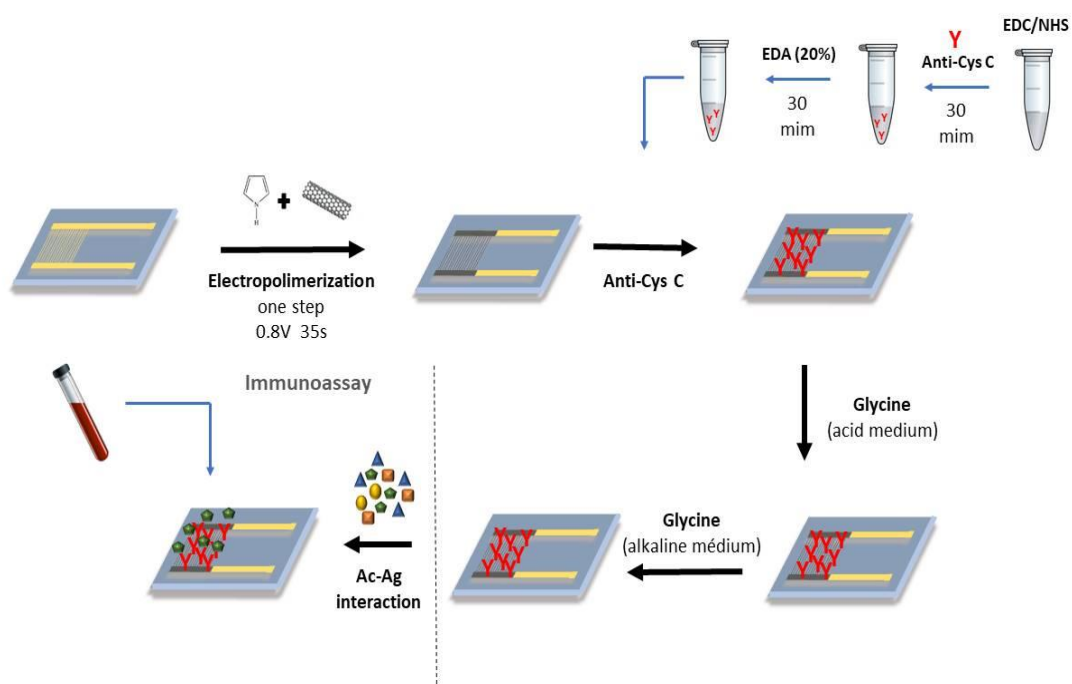


Fig. 3

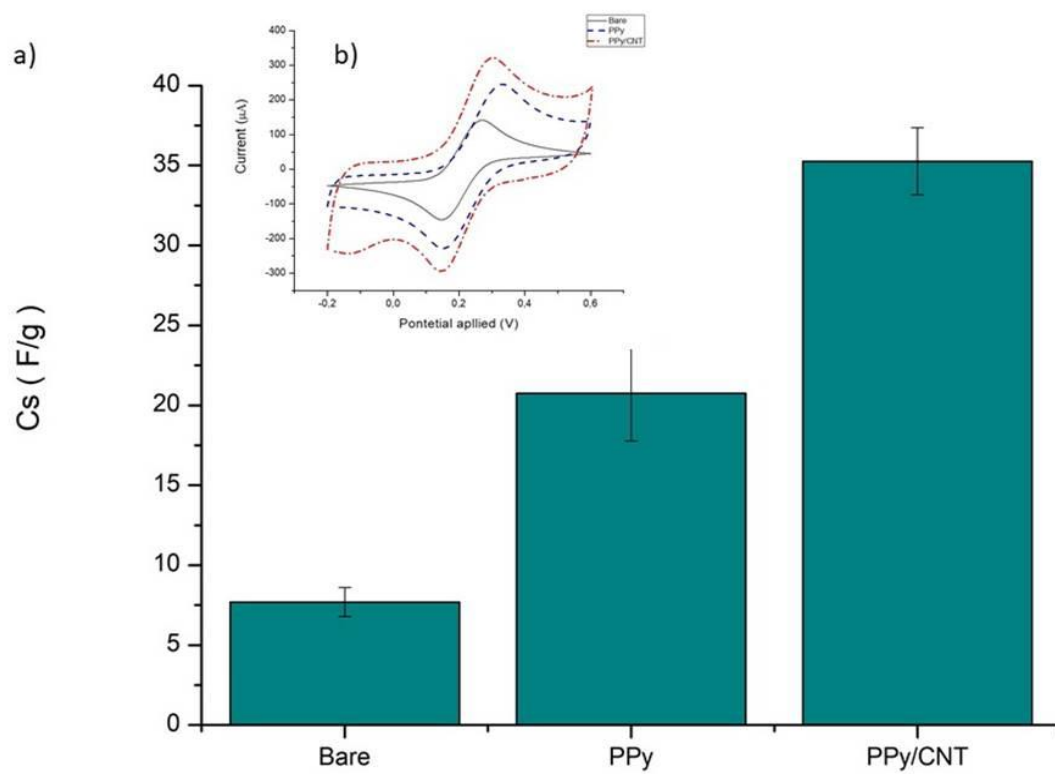


Fig. 4

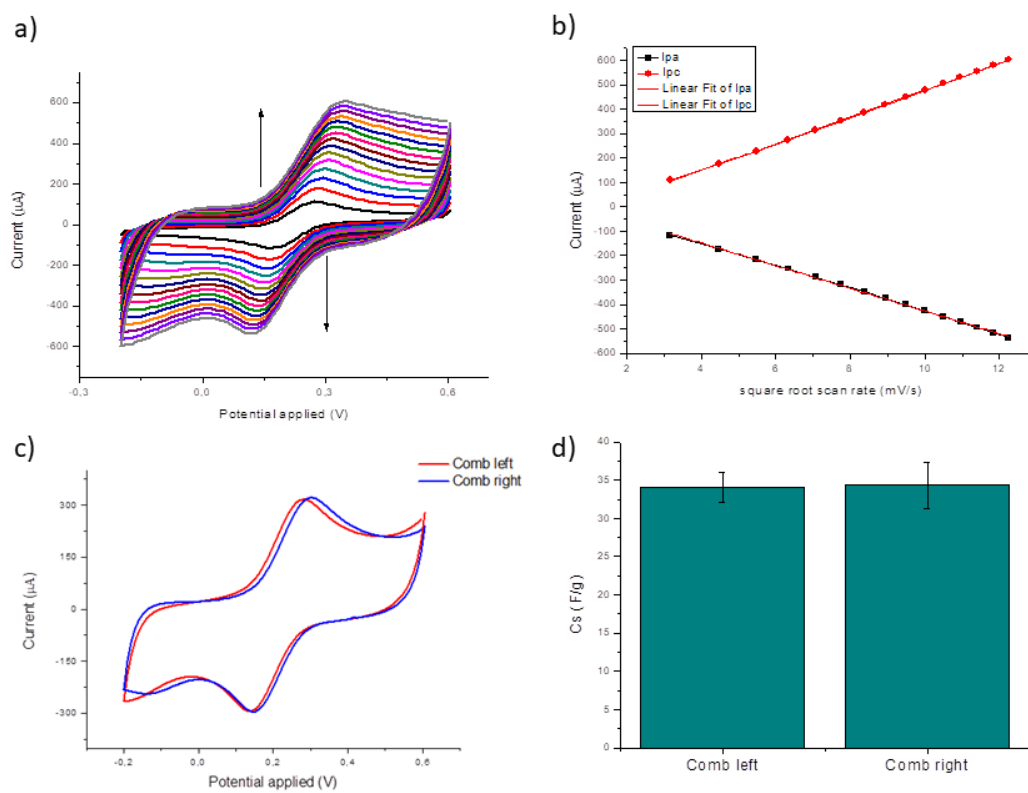


Fig. 5

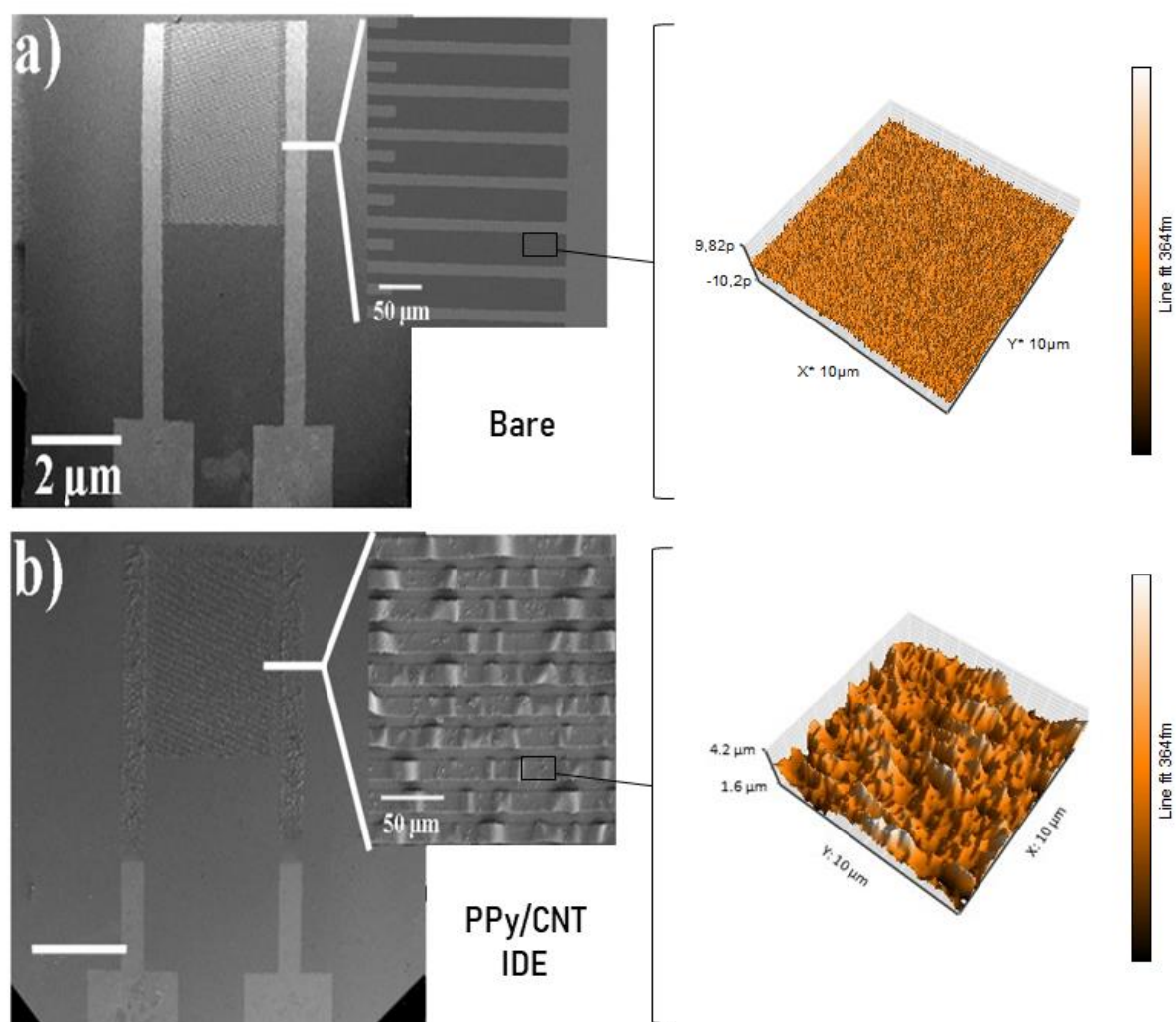
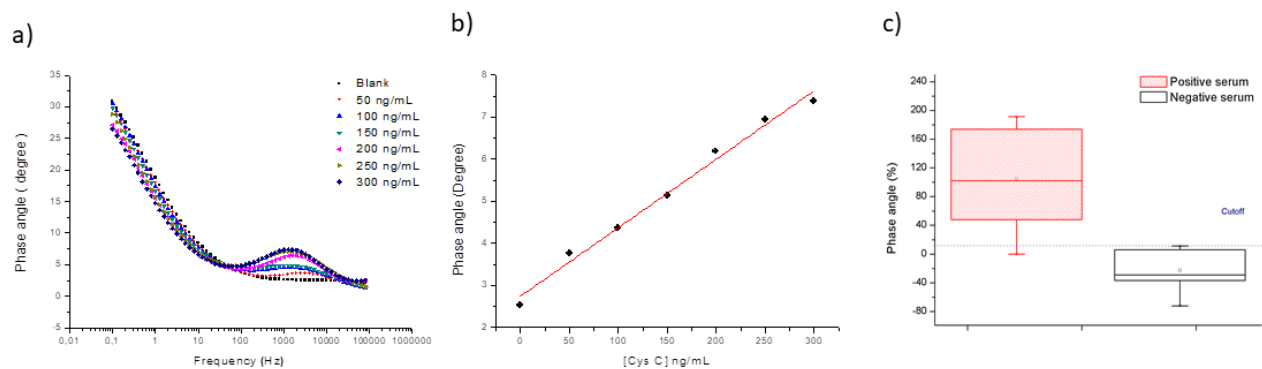


Fig. 6



SUPPLEMENTARY FIGURES

Fig. S1. Cyclic voltammograms obtained from bare and PPy/IDE in situ electropolymerization using the technique (a) Chronoamperometry and (b) Cyclic voltammetry.

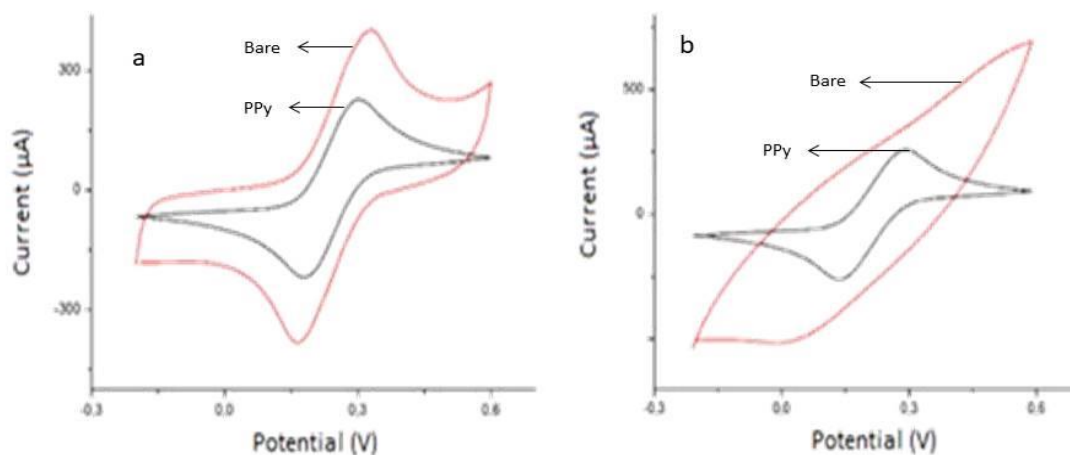


Fig.S2. CVs of modified IDEs with PPy film obtained in different scan rate: 10,20,30, 40, 50, 60, 70,80,90,100,110,0120,130,1400 and 150 mV/s (inner to outer). (b) Linear dependence of the anodic and cathodic currents of peaks with increase of square root of scan rate. Measurements performed with a redox probe of 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 0.1 KCl.

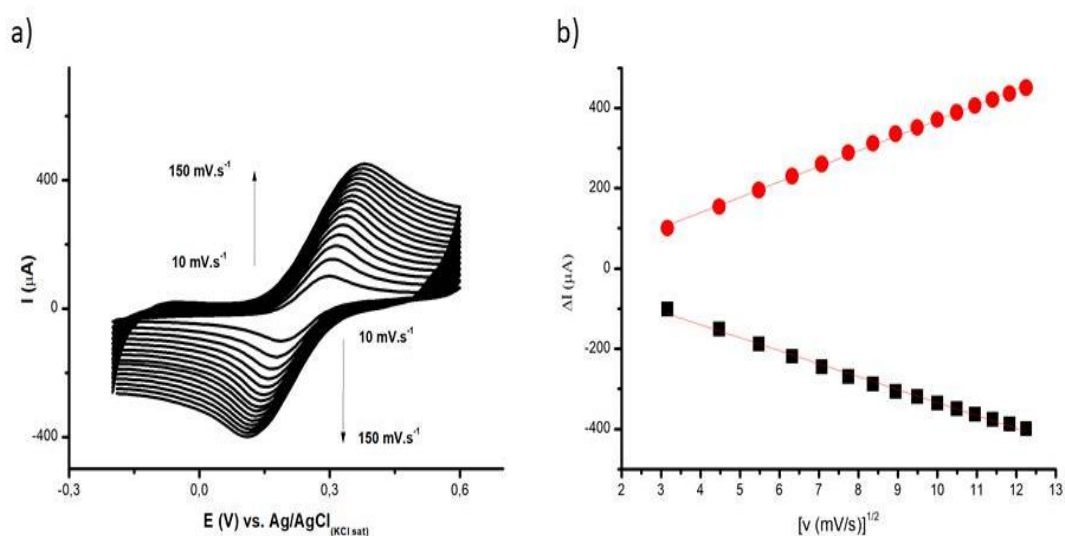


Fig.S3. CVs obtained by successive 30 cycles at 50 mV/s scan rate. Measurements performed in presence of 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 0.1 KCl redox probe.

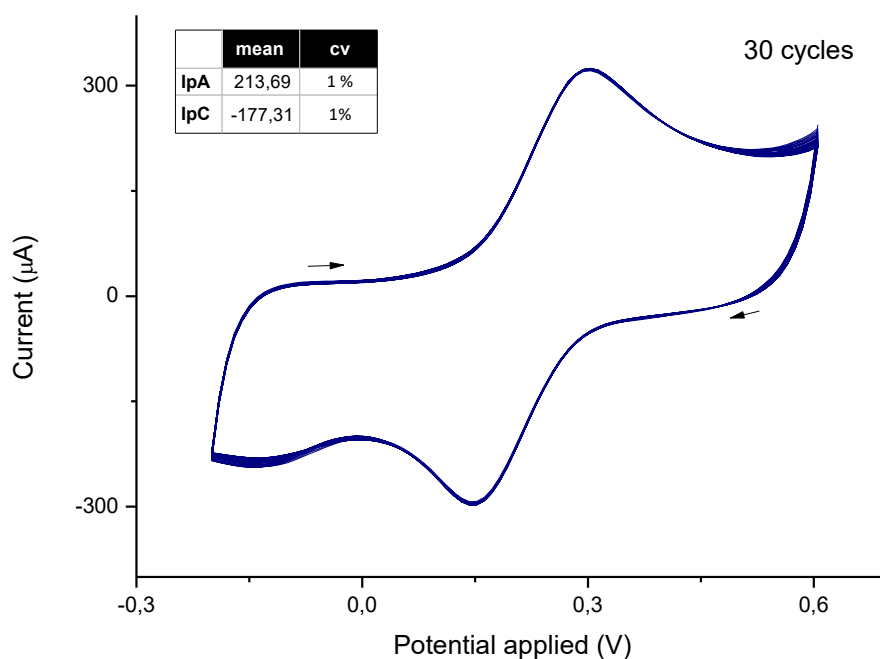


Fig.S4.

Typical cyclic voltammogram of the entrapment anti-CysC immobilization and glycine blocking. Measurements performed in presence 0.005 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ prepared in 0.1M KCl as redox probe.

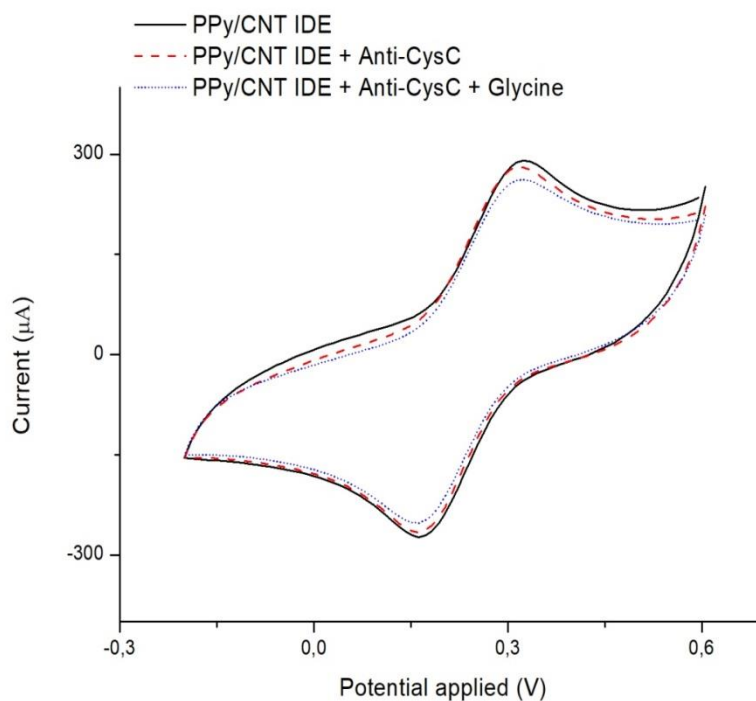


Fig. S5. Optimization of anti-CysC concentration as function of current response.

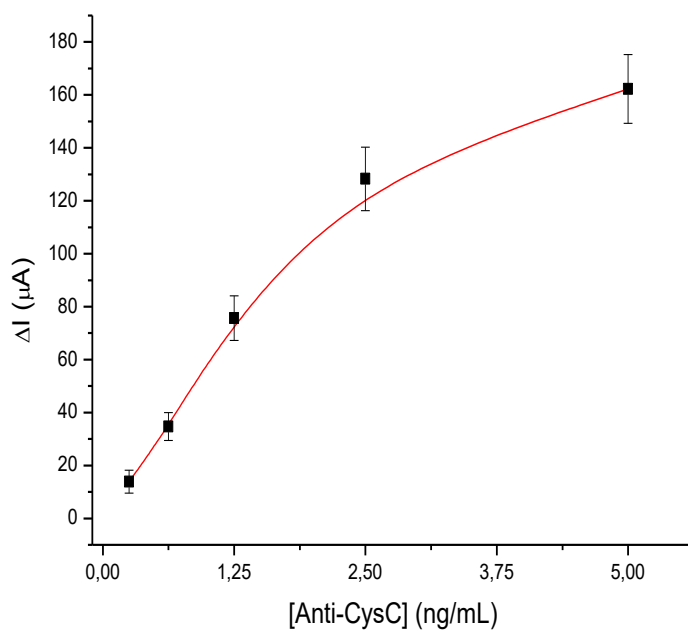
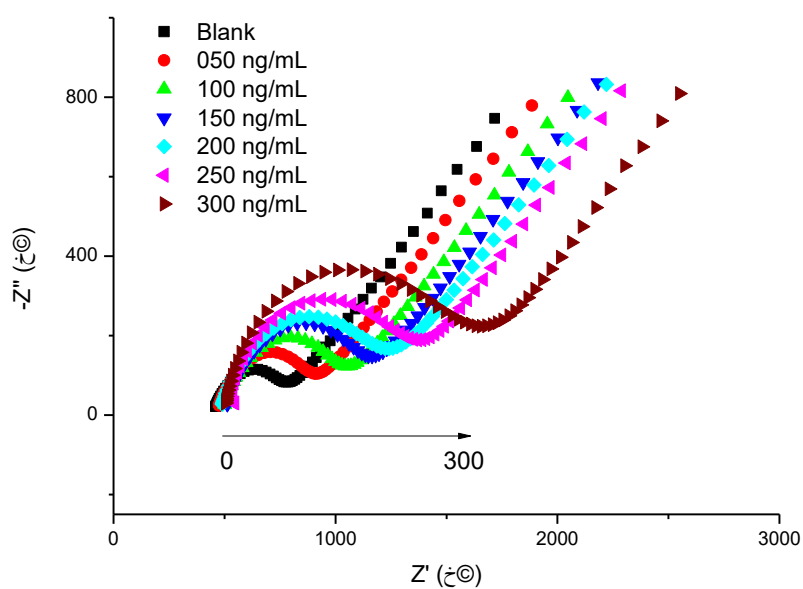


Fig. S6. Electrochemical impedance spectroscopy (Nyquist plots) obtained in responses to the blank and concentrations of 50, 100, 150, 200, 250 and 300 ng/mL CysC in spiked serum samples with the increase of semi-circle diameter (left to right). The frequency 1.4KHz was established at the peak corresponding to the maximum of the impedance imaginary part (Z'').



6 CONCLUSÕES

O nanocompósito PPy/CNT foi capaz de melhorar a resposta sensorial obtida e permitiu ancorar os anticorpos anti-CysC no eletrodo de forma estável. A modificação do IDE pelo filme de PPy/CNT agregou características de carga de armazenamento e capacitância específica elevadas. Dessa forma, foi possível detectar o CysC utilizando medição da capacitância, obtida com base nas medições de EIS. Os valores de R_{ct} confirmaram que a plataforma era capaz de quantificar a cistatina C. Assim, a plataforma sensora aqui desenvolvida pode ser aplicada ao diagnóstico e monitoramento da DRC, insuficiência renal aguda, bem como outros usos que a CysC possa permitir. Os materiais usados para a formação da plataforma sensora e o eletrodo escolhidos atendem aos requisitos para que o sistema proposto seja empregado em leitores portáteis. Pretende-se ainda realizar análise morfológica mais detalhada, utilizando as técnicas de microscopia de força atômica e de varredura eletrônica.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, A. et al. Polypyrrole/carbon nanotube supercapacitors: Technological advances and challenges. **Journal of Power Sources**, [S. l.] , v. 352, p. 174–186, jun. 2017.
- ALMEIDA, ANTÔNIO BONIFÁCIO DA; ALVES, VERONICA DE FÁTIMA; SILVA, SANDRO CAETANO DA. Qualidade de Vida do Paciente Renal Crônico em Hemodiálise. **Revista de Iniciação Científica da Libertas**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 83–93, 2012.
- AMMAR, H. B. et al. Boron doped diamond sensor for sensitive determination of metronidazole: Mechanistic and analytical study by cyclic voltammetry and square wave voltammetry. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 59, p. 604–610, 1 fev. 2016.
- ANDRADE, V. M. DE. **Confecção de Biossensores através da Imobilização de Biocomponentes por Eletropolimerização de Pirrol**. 2006. Dissertação (mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 10, p. 2341–2353, 2014.
- BANIUKEVIC, J. et al. Comparison of Oriented and Random Antibody Immobilization Techniques on the Efficiency of Immunosensor. **Procedia Engineering**, [S. l.], v. 47, p. 837–840, 2012.
- BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 248–253, 2010.
- BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'órgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.
- BASTOS, M. G.; OLIVEIRA, D. C. Q.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica no paciente idoso. **Revista HCPA**, [S. l.], v. 31, p. 52–65, 2011.
- BO, Z. et al. Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications. **Scientific Reports**, [S. l.], v. : 4684, n. 4, p. 1–8, 2014a.
- BRAS, C. D. H. **Desafios Da Trs No Brasil Doença Renal Crônica**. [S. l.], [S.n.] 2015.
- BRASIL. Diretrizes Clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica no Sistema Único de Saúde. **Ministério Da Saúde**, Brasília, n. 1, p. 1–37, 2014.
- CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA. Biossensores : estrutura , funcionamento e

aplicabilidade. *In: Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC*, 6, 2011, Goiás. **Anais [...]**. Goiás, [S.n.], p. 1–20, 2011.

CHEW, J. S. C. et al. Cystatin C--a paradigm of evidence based laboratory medicine. **The Clinical biochemist. Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 47–62, maio 2008.

CHINAGLIA, D. L. et al. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 4504.1-4504.9, 2008.

CHO, I.-H. et al. Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification. **Sensors**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 207, 12 jan. 2018.

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**, [S. l.], v. 146, p. 801–814, 1 jan. 2016.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quim. Nova**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

DE VASCONCELOS, E. A. et al. Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 870–876, 15 dez. 2009.

DESAI, D. et al. Ultrasensitive sensor for detection of early stage chronic kidney disease in human. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 90–94, 2018.

DHARNIDHARKA, V. R.; KWON, C.; STEVENS, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 221–226, 1 ago. 2002.

DSA, J. et al. Association Between Serum Cystatin C and Creatinine in Chronic Kidney Disease Subjects Attending a Tertiary Health Care Centre. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, [S. l.] v. 11, n. 4, p. BC09-BC12, abr. 2017.

DUTRA, R. F. et al. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 43, n. 5, 2007.

DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 376, n. 1–2, p. 114–120, fev. 2007.

ELESSAWY, N. A. et al. Development of High-Performance Supercapacitor based on a Novel Controllable Green Synthesis for 3D Nitrogen Doped Graphene. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1129, dez. 2019.

ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. NANOCOMPÓSITOS DE MATRIZ POLIMÉRICA: ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE DE MATERIAIS HÍBRIDOS. **Quim. Nova**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 798–806, 2004.

FANG, Y.; XU, L.; WANG, M. High-Throughput Preparation of Silk Fibroin Nanofibers by Modified Bubble-Electrospinning. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 471, jun. 2018.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors. A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 102, p. 470–478, 15 abr. 2018.

FENG, X. et al. Ratiometric biosensor array for multiplexed detection of microRNAs based on electrochemiluminescence coupled with cyclic voltammetry. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 75, p. 308–314, 15 jan. 2016.

FILHO, N. S.; BRITO, D. J. D. A. Doença renal crônica: a grande epidemia deste milênio. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, Maranhão, v. XXVIII, n. Supl. 2, p. 1–5, 2006.

FINNEY, H.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. **Annals of Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 49–59, jan. 2000.

FRACKOWIAK, E. et al. Supercapacitors based on conducting polymers/nanotubes composites. **Journal of Power Sources**, [S. l.], v. 153, n. 2, p. 413–418, fev. 2006.

GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 261–267, jun. 2011.

GARCÍA, M. F. et al. Cistatina C en la evaluación de la función renal. **Revista del Laboratorio Clínico**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 50–62, 2011.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T. ALGUNS ASPECTOS DE IMUNOENSAIOS APLICADOS À QUÍMICA ANALÍTICA. **Química Nova**. São Paulo, v. 22, n. 6, 1999.

GOODING, J. J. et al. Electrochemical modulation of antigen-antibody binding. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 260–268, 2004.

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

GORODKIEWICZ, E.; LUSZCZYN, J. Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) Sensor for Cystatin Determination Based on Immobilized Papain. **Protein and Peptide Letters**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 23–29, 2011.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 149, n. 1, p. 252–258, 6 ago. 2010.

GUIMERÀ, A. et al. Effect of surface conductivity on the sensitivity of interdigitated impedimetric sensors and their design considerations. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 207, n. PB, p. 1010–1018, 2015.

GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological**

Macromolecules, [S. l.], v. 108, p. 687–703, 2018.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. v. 53.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 275, n. August, p. 61–68, 2018.

HASSAN, K. et al. CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS QUANTO AO USO DA VOLTAMETRIA DE VARREDURA ESCALONADA EM PROCESSOS ADSORTIVOS. **Quim. Nova**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 431–435, 2015.

HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. e0158765, 6 jul. 2016.

HOEFER, M.; BANDARU, P. R. Determination and enhancement of the capacitance contributions in carbon nanotube based electrode systems. **Applied Physics Letters**, [S. l.], v. 95, p. 183108-3, 2009.

HU, C.-F. et al. Development of 3D carbon nanotube interdigitated finger electrodes on polymer substrate for flexible capacitive sensor application. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 44, p. 444006, nov. 2013.

JAGADALE, S. D. et al. Functionalized crown ether assisted morphological tuning of CuO nanosheets for electrochemical supercapacitors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 816, p. 99–106, 1 maio 2018.

JEON, I.-Y. et al. Functionalization of Carbon Nanotubes. In: YELLAMPALLI, S. (Ed.). **Carbon Nanotubes – Polymer Nanocomposites**. [S. l.]: IntechOpen, 2011. p. 91–110.

JI, H. et al. Quantification of cystatin-C in human serum by stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1059, p. 49–55, ago. 2017.

JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1–3, 2004.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODRIMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 79, p. 88–105, 1 maio 2016.

KYHSE-ANDERSEN, J. et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. **Clinical chemistry**, [S. l.], v. 40, n. 10, p. 1921–6, out. 1994.

LEELAHAVANICHKUL, A. et al. Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 307, n. 8, p. F939–F948, 15 out. 2014.

LETO, G.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C. On the role of cystatin C in cancer progression. **Life Sciences**, [S. l.], v. 202, p. 152–160, 1 jun. 2018.

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

LI, X. et al. Dual mode competitive electrochemical immunoassay for B-type natriuretic peptide based on GS/SnO₂/polyaniline-Au and ZnCo₂O₄/N-CNTs. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], 2018.

LIN, H. et al. Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 256–261, 2013.

LOTA, K. et al. Carbon / polypyrrole composites for electrochemical capacitors. **Synthetic Metals**, [S. l.], v. 203, p. 44–48, 2015a.

LOTA, K. et al. Carbon/polypyrrole composites for electrochemical capacitors. **Synthetic Metals**, [S. l.], v. 203, p. 44–48, maio 2015b.

MACKAY, S. et al. Simulating electrical properties of interdigitated electrode designs for impedance-based biosensing applications. *In*: Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering (CCECE), 28, 2015. **Anais [...]**: IEEE, 2015. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7129305/>. Acesso em: 16/11/2018.

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 235-IN6, 1 set. 1965.

MATHEWS, P. M.; LEVY, E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], v. 32, p. 38–50, 1 dez. 2016.

MAZLAN, N. S. et al. Interdigitated electrodes as impedance and capacitance biosensors: A review. *In*: Electronic and Green Materials International Conference, 3, 2017. **Anais: AIP Conference Proceedings** [S. l.]: AIP Publishing, 2017.

MI, L. et al. A novel photoelectrochemical immunosensor by integration of nanobody and TiO₂ nanotubes for sensitive detection of serum cystatin C. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 902, p. 107–114, 1 jan. 2016.

MIHAILESCU, C.-M. et al. A Sensitive capacitive immunosensor for direct detection of human heart fatty acid-binding protein (h-FABP). **Talanta**, [S. l.], v. 132, p. 37–43, jan. 2015.

MOREIRA, J. M. et al. Neuropsychiatric disorders and renal diseases: an update. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 396–400, 2014.

MURTY, M. S. N. et al. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury. **Indian journal of nephrology**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 180–3, maio 2013.

N., R.; MADHU; AWASTHI, R. Polypyrrole Composites: Electrochemical Synthesis,

Characterizations and Applications. *In: Electropolymerization*. [S.l.: S.n.]. p. 131–157, 2011.

NASERI, M.; FOTOUHI, L.; EHSANI, A. Recent Progress in the Development of Conducting Polymer-Based Nanocomposites for Electrochemical Biosensors Applications : A Mini-Review. **Chem. Rec**, [S.l.], v. 18, p. 599–618, 2018.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Am J Kidney Dis**, [S.l.], v. 39, p. S1–S266, 2002.

NEJAT, M. et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. **Critical Care**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. R85, 2010.

OKAY, T. S. Cistatina C: um novo marcador de função renal em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 112–113, jun. 2002.

ONOPIUK, A.; TOKARZEWICZ, A.; GORODKIEWICZ, E. Cystatin C: A Kidney Function Biomarker. **Advances in Clinical Chemistry**, [S.l.], v. 68, p. 57–69, 1 jan. 2015a.

ONOPIUK, A.; TOKARZEWICZ, A.; GORODKIEWICZ, E. Cystatin C: A Kidney Function Biomarker. *In: Advances in Clinical Chemistry*. [S.l.] Elsevier, 2015b. v. 68p. 57–69.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

POWELL, T. C. et al. Cystatin C and long term risk of community-acquired sepsis: a population-based cohort study. **BMC Nephrology**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 61, 23 dez. 2015.

RAMANAVIČIUS, A.; RAMANAVIČIENĖ, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica Acta**, [S.l.], v. 51, n. 27, p. 6025–6037, 25 ago. 2006.

REZAEI, B. et al. An electrochemical immunosensor for cardiac Troponin I using electrospun carboxylated multi-walled carbon nanotube-whiskered nanofibres. **Talanta**, [S.l.], v. 182, n. January, p. 178–186, 2018.

SABOURAUD, G. et al. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 283–293, 1 jan. 2000.

SAJID, H.; MAHMOOD, T.; AYUB, K. High sensitivity of polypyrrole sensor for uric acid over urea, acetamide and sulfonamide: A density functional theory study. **Synthetic Metals**, [S.l.], v. 235, p. 49–60, 1 jan. 2018.

SALGADO, J. V.; SOUZA, F. L.; SALGADO, B. J. How to understand the association between cystatin C levels and cardiovascular disease: Imbalance, counterbalance, or consequence? **Journal of Cardiology**, [S.l.], v. 62, n. 6, p. 331–335, 1 dez. 2013.

SCHNOOR, T. I. W. et al. The production of aligned MWCNT/polypyrrole composite films. **Carbon**, [S.l.], v. 60, p. 229–235, ago. 2013.

SESSO, R. C. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. **J Bras Nefrol**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 261-266, 2017.

SHARMA, R. et al. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 80, p. 607–613, 15 jun. 2016.

SHLIPAK, M. G. et al. Cystatin C and the Risk of Death and Cardiovascular Events among Elderly Persons. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 352, n. 20, p. 2049–2060, 19 maio 2005.

SHLIPAK, M. G. et al. Cystatin C versus Creatinine in Determining Risk Based on Kidney Function. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 369, n. 10, p. 932–943, 5 set. 2013.

SIGTAP - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS. Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/procedimento/exibir/0305020056/02/2018>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured electrochemical immunosensor for detection of serological alkaline phosphatase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 171, n. July, p. 413–418, 2018.

SMITH, S. K. et al. Quantitative Comparison of Enzyme Immobilization Strategies for Glucose Biosensing in Real-Time Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry Coupled with Carbon-Fiber Microelectrodes. **ChemPhysChem**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 1197–1204, 22 maio 2018.

STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M. **Conducting polypyrrole nanotubes: a review**. [S. l.]: Springer International Publishing, 2018.

STEVENS, L. A. et al. Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 354, n. 23, p. 2473–2483, 8 jun. 2006.

SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: The impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 87, p. 373–387, 15 jan. 2017.

TAO, J.; ZHAO, P.; ZENG, Q. The determination of cystatin C in serum based on label-free and near-infrared light emitted PbS@BSA QDs. **J. Mater. Chem. B**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 4258–4262, 2016.

THE NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **About Chronic Kidney Disease**. Disponível em: <<https://www.kidney.org/atoz/content/about-chronic-kidney-disease>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

TKACHENKO, L. I. et al. One-Step Synthesis of the Polyaniline–Single-Walled Carbon Tubes Nanocomposite in Formic Acid and Its Electrochemical Properties. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 617–623, jul. 2018.

TRINDADE, E. K. G.; DUTRA, R. F. A label-free and reagentless immunoelectrode for antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) detection. **Colloids and**

Surfaces B: Biointerfaces, [S. I.], v. 172, p. 272–279, dez. 2018.

TROJANOWICZ, M. Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. I.], 2016.

VALENTINI, F. et al. Single Walled Carbon Nanotubes/polypyrrole-GOx composite films to modify gold microelectrodes for glucose biosensors: Study of the extended linearity. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. I.], v. 43, n. 1, p. 75–78, 2013.

VAN DER LAAN, S. W. et al. Cystatin C and Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. I.], v. 68, n. 9, p. 934–45, 2016.

VAN GERWEN, P. et al. Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. I.], v. 49, n. 1–2, p. 73–80, 1998.

WANG, L. et al. A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. I.], v. 87, p. 646–653, 2017.

WANG, R. et al. A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of *E. coli* O157:H7. **Biosensors**, [S. I.], v. 5, n. 4, p. 791–803, 2015.

WEBSTER, A. C. et al. Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, [S. I.], v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, 25 mar. 2017.

WEN, W. et al. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **Analytical Chemistry**, [S. I.], v. 89, n. 1, p. 138–156, 3 jan. 2017.

XU, Y. et al. Configuration and capacitance properties of polypyrrole/aligned carbon nanotubes synthesized by electropolymerization. **Chinese Sci Bull**, [S. I.], v. 56, p. 3823–3828, 2011.

YANG, L.; LI, Y.; ERF, G. F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Chemistry**, [S. I.], v. 76, n. 4, p. 1107–1113, 2004.

YANG, W. et al. Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. I.], v. 49, n. 12, p. 2114–2138, 2010.

YANG, Z. H. et al. Highly Effective Protein Converting Strategy for Ultrasensitive Electrochemical Assay of Cystatin C. **Analytical Chemistry**, [S. I.], v. 88, n. 10, p. 5189–5196, 2016.

YESI, Y. et al. Directly-Grown Hierarchical Carbon Nanotube@Polypyrrole Core-Shell Hybrid for High-Performance Flexible Supercapacitors. **ChemSusChem**, [S. I.], v. 9, n. 4, p. 370–378, 2016.

ZHANG, J. et al. An immobilization-free electrochemical impedance biosensor based on duplex-specific nuclease assisted target recycling for amplified detection of microRNA. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. I.], v. 75, p. 452–457, 15 jan. 2016.

ZHAO, C. et al. Three dimensional (3D) printed electrodes for interdigitated supercapacitors. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 41, p. 20–23, abr. 2014.

ZI, M.; XU, Y. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. **Immunology Letters**, [S. l.], v. 196, p. 80–90, 1 abr. 2018.

ZOU, Z. et al. Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement. **Sensors and Actuators A: Physical**, [S. l.], v. 136, n. 2, p. 518–526, maio 2007.