



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNOSSENSOR BASEADO EM GRAFENO-POLISSULFONA PARA
DETECÇÃO DA ARTRITE REUMATÓIDE: ANTIPEPTÍDEO CITRULINADO**

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

**Recife
2016**

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

**IMUNOSSENSOR BASEADO EM GRAFENO-POLISSULFONA PARA
DETECÇÃO DA ARTRITE REUMATÓIDE: ANTIPEPTÍDEO CITRULINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade de Federal Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

Recife

2016

Catálogo na fonte

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

S586i Silva Júnior, Auvani Antunes da.

Imunossensor baseado em grafeno-polissulfona para detecção da artrite reumatoide: antipeptídeo citrulinado / Auvani Antunes da Silva Júnior. 2016.

82 folhas, il.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, 2016.

Inclui Referências.

1. Engenharia Biomédica. 2. Artrite reumatoide. 3. Imunossensor. 4. Anti-Citrulina (Anti-PCC). I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orientadora). II. Título.

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

**IMUNOSSENSOR BASEADO EM GRAFENO-POLISSULFONA PARA
DETECÇÃO DE ARTRITE REUMATOIDE: ANTIPEPTÍDEO CITRULINADO**

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

Orientador: _____

Profª Drª Rosa Amália Fireman Dutra, Doutor pela
Universidade Federal de Pernambuco – Recife,
Brasil.

Banca Examinadora:

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

Profª Drª Maria Danielly Lima de Oliveira, UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil.

Profª Drª Rosa Amália Fireman Dutra, UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil.

Recife, 09 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me dar forças nos dias que mais precisei.

Ao meu pai **Auvani Antunes** e a minha mãe **Marlene Galindo** por me educarem, me criarem para a vida e ensinarem a sempre voar alto e suportarem minhas ausências sempre que se fez necessário.

Ao meu irmão **Rodrigo Galindo** por sempre me apoiar e entender minhas escolhas. Aos meus familiares e amigos que sempre me incentivaram e alguns que me veem como inspiração para ir além.

Gostaria de agradecer imensamente a professora Dra. **Rosa Fireman** pela oportunidade de tê-la como orientadora e pela paciência.

Agradecer a **Blanca Azucena**, por ser amiga, companheira para todos os momentos de risadas, responsabilidade e medos, com quem pude aprender vários ensinamentos.

Agradecer em especial aos companheiros de pesquisa LAPED (Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico), em especial **Barbara Virginia, Priscila Marcelino, Erika Trindade, Erica Lima, Gilvania Silva, Amanda Oliveira**, pelas dicas e apoios científicos.

Gostaria de agradecer aos irmãos que não são de sangue, mas são irmãos que a vida nos dá e escolhemos como **Bruno Furtado, Hewerton Paes**, pelas parcerias, apoios e as conversas de risadas e distração necessárias para a vida, a **Vanessa Lino** com quem sempre mantivemos uma amizade de irmandade mesmo distante fisicamente.

Agradecer em especial a **Juliana Lima**, por sempre ser minha amiga, confidente, parceira, e estar comigo todas as horas que mais precisei e com quem sempre dividi minhas verdades e obrigado por sempre me apoiar e cuidar de mim.

Agradecer a **Universidade Federal de Pernambuco** por oportunizar o programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia Biomédica. E agradecer a **CAPES** entidade mantenedora de bolsas de incentivo à pesquisa.

E agradecer a todos que de alguma forma contribuíram no decorrer da caminhada.

RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença crônico-degenerativa, sistêmica, auto-imune. Atualmente, o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-PCC) é considerado o marcador mais importante para o diagnóstico preditivo e prognóstico da AR. Neste trabalho, desenvolveu-se um imunossensor eletroquímico para detecção do Anti-PCC, a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido-polissulfona (Gor-PSF) o qual apresenta boas características de aumento da área eletrocatalítica e imobilização de moléculas biológicas. Foram realizadas capturas de imagens micrográficas por microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho antes e após sua modificação, pelas quais foi possível comprovar uma superfície lisa não modificada sem estruturas adsorvidas após limpeza física, e que a superfície modificada com Gor-PSF apresentou um recobrimento ideal de toda a superfície com a presença de uma estrutura esponjosa comprovando a modificação da área de trabalho. Para captura do Anti-PCC, antígenos citrulina (CCP-Ag) foram imobilizados sobre a superfície eletródica do nanocompósito por provável ligação covalente entre os grupos amino e carboxílicos presentes no CCP-Ag e no óxido de grafeno reduzido, respectivamente. A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) foi empregada para detecção do Anti-PCC, produzindo um imunossensor livre de marcação. Observou-se que o GOR-PSF foi capaz de aumentar a corrente de pico anódico (I_{pa}) 2,2 vezes mais, comparado com o controle (sem GOR-PSF) demonstrando que o filme proporcionou melhor capacidade eletrocatalítica, sendo também estável (coeficiente de variação da corrente $< 1\%$) avaliado por submeter o eletrodo a 20 ciclos consecutivos de voltametria cíclica. O imunossensor proposto apresentou uma boa linearidade com $r=0,983$ ($p<0.003$; $n = 5$) e limite de detecção de $0,004$ ng/mL de Anti-PCC. A plataforma sensora demonstrou propriedades desejáveis de estabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade na detecção de Anti-PCC com perspectivas de desenvolvimento de dispositivos “point-of-care”.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide. Imunossensor. Anti-Citrulina (Anti-PCC).

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic degenerative disease, systemic, autoimmune. Currently, the cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) is considered the most important predictive marker for the diagnosis and prognosis of RA. In this work, we developed an electrochemical immunosensor for the detection of anti-CCP, from the surface modification of a glassy carbon electrode with nanocomposite reduced-polysulfone graphene oxide (GOr-PSU) which has good rise characteristics of electrocatalytic area and immobilization of biological molecules. Scanning electron microscopy images were performed before and after modification, by which it was possible to establish a smooth unmodified surface without adsorbed structures after physical cleaning, and that the modified surface with GOr-PSU presented an ideal coating the entire surface with the presence of a spongy structure confirming the modification of the work area. For capture of anti-CCP, citrulline antigens (Ag-CCP) were immobilized on the electrode surface of the nanocomposite probably due to covalent bond between the amino and carboxylic groups present in the CCP-Ag and the reduced graphene oxide, respectively. Square wave voltammetry technique (SWV) was used for detection of anti-CCP producing a marking-free immunosensor. It was observed that the GOR-PSU was capable of increasing the anodic peak current (IPA) 2.2 times as compared with the control (without GOr-PSU) demonstrating that the electrocatalytic film provided better capacity also being stable (coefficient the variation of the current <1%) evaluated by subjecting the electrode 20 consecutive cycles of cyclic voltammetry. The proposed immunosensor exhibited good linearity with $r = 0.983$ ($p < 0.003$; $n = 5$) and a detection limit of 0.004 ng / ml anti-CCP. The sensing platform demonstrated desirable properties of stability, sensitivity and reproducibility in the Anti-CCP detection with prospects of development of devices "point-of-care."

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Immunosensor. Anti-citrulline (Anti-PCC).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Artrite Reumatóide	17
2.1.1 Conceito.....	17
2.1.2 Desenvolvimento Imune da AR.....	18
2.1.3 Marcadores da AR.....	19
2.1.4 Diagnóstico Anti-PCC.....	20
2.2 Biossensores.....	21
2.2.1 Imunossensores.....	23
2.2.2 Aplicação de nanomateriais aos imunossensores.....	24
2.2.3 Grafeno.....	25
2.2.4 Polissulfona.....	27
2.2.5 Grafeno com polissulfona.....	27
2.3 Técnicas eletroquímicas.....	28
2.3.1 Voltametria Cíclica.....	29
2.3.2 Voltametria de onda quadrada.....	30
2.4 Caracterização Morfológica.....	31
2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
3. OBJETIVO.....	34
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivo Específico	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Reagentes.....	37
4.2 Equipamentos.....	37
4.3 Caracterização Morfológica.....	38

4.3.1 Microscopia eletrônica de Varredura.....	38
4.4 Preparação do eletrodo de trabalho.....	39
4.4.1 Limpeza da superfície de trabalho.....	39
4.4.2 Construção do filme de grafeno com polissulfona.....	39
4.4.3 Imobilização dos antígenos de citrulina.....	39
4.4.4 Imunoensaios eletroquímicos.....	40
4.5 Otimização dos parâmetros experimentais.....	40
4.5.1 Estudos de estabilidade de filme de grafeno com polissulfona.....	41
4.5.2 Influência da velocidade de varredura.....	41
4.5.3 Influência da concentração de Anti-PCC.....	41
4.5.4 Curva de calibração.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	44
5.2 Preparação de limpeza de superfície sensora.....	46
5.3 Modificação da superfície de trabalho.....	47
5.4 Caracterização eletroquímica do filme de GPS.....	48
5.4.1 Estudo de estabilidade e mecanísticos.....	48
5.4.2 Estudo da variação de velocidade de varredura.....	49
5.5 Caracterização eletroquímica do imunossensor.....	50
5.6 Otimização dos parâmetros do imunossensor.....	52
5.6.1 Curva de imobilização de antígeno citrulina.....	52
5.6.2 Curva de concentração Anti-PCC.....	53
5.6.3 Comparação de Curva de concentração anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado (Anti-PCC) e Imunoglobulina Humana (IgG)	55
6. Conclusão.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características fisiopatologia presentes na AR.....	18
Figura 2: Citrulinização (deaminação) da peptidilarginina pela PAD; O grupo guanidino da arginina é hidrolisado produzindo um grupo ureido e amônia.....	20
Figura 3 Esquema básico de um biossensor: A) Elemento de reconhecimento, B) Transdutor, C) Unidade de processamento de sinal.....	22
Figura 4. Expansão esperada para o mercado de biossensores previsto por CARG de 11,5% de 2009 a 2016 (THUSU, 2010)	23
Figura 5: Representação estrutural do grafeno.....	26
Figura 6: Representação estrutural da Polissulfona.....	27
Figura 7: Representação esquemática de grafeno com polissulfona.....	28
Figura 8: Técnica de VC. (a) Relação potencial-tempo (b) Resposta de corrente obtida da perturbação aplicada.....	30
Figura 9: Representação esquemática da voltametria de onda quadrada.....	31
Figura 10: Esquema de funcionamento do MEV.....	32
Figura 11: Desenho esquemático do aparatos experimental utilizado. A – Célula eletroquímica representando os 03 eletrodos: (a) de Referência, (b) de Trabalho e (c) Auxiliar; B – Potenciostato; C – Microcomputador.....	38
Figura 12: Dispersão da GOR-PSF e caracterização da GOR-PSF: A) Dispersões de GOR-PSF em água, DMF e clorofórmio; B) GOR-PSF em pó.....	44

Figura 13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície de eletrodo de carbono vítreo modificado. A) ECV não modificado; B) Grafite-polissulfona sobre ECV; C) NTC/ polissulfona sobre ECV; D) GOR-PSF sobre ECV.....	45
Figura 14: Voltametria cíclica da superfície limpa.....	46
Figura 15: Voltametria cíclica: a) GOR-PSF; b) GOR; c) ECV limpo.....	47
Figura 16: VCs demonstrando estabilidade da membrana de GOR-PSF após 15 ciclos consecutivos a 50 mV s^{-1}	48
Figura 17: (A) Vcs do ECV/compósito sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 mV s^{-1}). Medidas realizadas em ferrocianeto e ferricianetode potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) preparado em KCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); (B) Dependência das correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	49
Figura 18: (I) VCs e (II) VPD das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/GOR-PSF; (c) ECV/GOR-PSF/CCP-Ag; (d) ECV/GOR-PSF/CCP-Ag/GLICINA; (e) ECV/GOR-PSF/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC. Medidas realizadas em solução de $0,005 \text{ M}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada em $0,1 \text{ M}$ de KCl.....	51
Figura 19: Influência das diferentes concentrações de CCP-Ag imobilizado sobre o ECV/GOR-PSF/CCP-Ag. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de $0,005 \text{ M}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada em $0,1 \text{ M}$ de KCl.....	53

Figura 20: Influência das diferentes concentrações de Anti-PCC imobilizado sobre o ECV/GOR-PSF/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	54
Figura 21: Curva analítica do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de Anti-PCC. Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	55
Figura 22: Comparação da Influência das diferentes concentrações de Anti-PCC e IgG imobilizado sobre o ECV/GOR-PSF/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC e ECV/GOR-PSF/CCP-Ag/GLICINA/IgG. Medidas obtidas através de análises por VOQ em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac - Anticorpo

Anti-PCC - Anticorpo Antipeptídeo Citrulinado Cíclico

Ag - Antígeno

AR -Artrite Reumatóide

CCP-Ag – Antígeno citrulina

E – Potencial

ECV - Eletrodo de carbono vítreo

ELISA- *Enzyme Linked Immuno absorbent Assay*

Epa -Potencial de pico anódico

Epc -Potencial de pico catódico

Fab - Fragmento ab

Fc -Fração constante

FR - Fator reumatoide

GOr – Óxido de grafeno reduzido

GOr-PSU – Óxido de Grafeno reduzido-Polissulfona

IFN- γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulinas

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

Ipa – Corrente de pico anódico

Ipc – Corrente de pico catódico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Proteína C reativa

QCM - *Quartz Crystal Microbalance*

SPR- *Surface Plasmon Resonance*

VOQ- Voltametria de onda quadrada

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

$U^{1/2}$ – Raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial

VC - Voltametria cíclica

VPD - Voltametria de pulso diferencial

ΔI – Variações de picos de corrente

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo da ciência em grande expansão, com importante impacto nas áreas de materiais, eletrônica e medicina. Particularmente, a utilização de nanomateriais tem despertado grande interesse nos últimos anos, no desenvolvimento de biossensores, particularmente imunossensores. Os imunossensores são dispositivos baseados em reações imunológicas, sendo imobilizados antígenos ou anticorpos sobre uma superfície transdutora. Estes possuem alta confiabilidade, devido à especificidade e seletividade da interação antígeno-anticorpo, constituindo uma importante ferramenta analítica.

O desenvolvimento de imunossensores para o diagnóstico de doenças autoimunes como a artrite reumatoide (AR), tem despertado o interesse de pesquisadores, pela necessidade de testes seguros e de rápido processamento de resultados. E desta forma escolher a terapêutica adequada e obter um melhor prognóstico do paciente. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 0,5 a 1% da população mundial possui AR (OMS, 2013). Assim, o diagnóstico precoce da AR é considerado um fator fundamental para uma evolução menos incomoda dos pacientes e a redução da mortalidade decorrente do agravamento da doença.

O anticorpo antiptéideocitrulinado cíclico (Anti-PCC) detectado por ensaio imunenzimático (ELISA - do inglês *Enzyme linked immunosorbent assay*) é considerado um dos marcadores mais sensíveis para diagnóstico e prognóstico da AR. Este marcador é indicativo de pré-disposição para desenvolvimento da AR devido a sua alta especificidade de 90% e sensibilidade de 80%. A detecção do Anti-PCC em imunossensores eletroquímicos se diferenciam do teste de ELISA por permitir a detecção e quantificação de níveis ainda mais baixos do anticorpo, o que facilita uma rápida detecção da AR, reduzindo o custo envolvido no processo terapêutico.

Assim, na procura de aperfeiçoar os imunossensores eletroquímicos têm-se como objetivos melhorar as características, tais como: 1) melhor atividade eletrocatalítica, 2) uma boa imobilização de biomoléculas com a plataforma sensora, 3) alta sensibilidade e especificidade, vários tipos de nanomateriais têm sido aplicados no aperfeiçoamento destes. Esses nanomateriais permitem o aumento da área reativa e da transferência de elétrons na interface sensora, contribuindo, conseqüentemente, para

uma maior condutividade e quantidade de moléculas imobilizadas. Destacando-se: nanotubos de carbono (NTC), nanopartículas (NPs), polímeros condutores, grafeno, entre outros.

Recentemente, o grafeno tem sido usado como plataforma para construção de imunossensores eletroquímicos por suas extraordinárias propriedades tais como: alta estabilidade mecânica, boa condutividade térmica e elétrica, forte aderência com biomoléculas entre outras. O grafeno é um alótropo de carbono com ligações do tipo sp^2 , possuindo alta área superficial e espessura atômica. A modificação do grafeno com polímeros pode melhorar e proporcionar novas propriedades. Os polímeros biocompatíveis como a polissulfona (PSF) possui características capazes de suportar variações extremas de pH, permite uma boa imobilização de biomoléculas e pode ser aplicado em imunossensores tipo tatuagem que possam ser aderidos a pele para monitoramento de patologias, o que torna a PSF atraente para aplicação em imunossensores.

Neste trabalho, desenvolveu-se um imunossensor empregando o nanocompósito de oxido de grafeno reduzido com polissulfona formando uma plataforma sensora através da técnica de *drop casting*, para imobilizar o antígeno citrulina (CCP) e detectar eletroquimicamente o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-PCC) e assim diagnosticar a AR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Artrite Reumatóide

2.1.1. Conceito

A artrite reumatoide (AR) foi inicialmente conceituada no ano de 1850 como uma inflamação nas articulações, porém apenas em 1960 foram desenvolvidos critérios para seu diagnóstico (SCOTT *et al.*, 2010). A AR é definida como uma doença autoimune sistêmica de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva a deformidade e destruição das articulações em virtude de erosões ósseas e da cartilagem, comprometendo as funções dos movimentos articulares (BIZZARO *et al.*, 2001).

A AR acomete 0,5 - 1% da população adulta em regiões desenvolvidas (CARMONA *et al.*, 2010; CHOY, 2012). Geralmente, está associada à incapacidade funcional progressiva, complicações sistêmicas, morte prematura, isto devido às complicações da clínica do paciente acometido pela AR e a custos socioeconômicos (MCINNES; SCHETT, 2011). Embora alguns pacientes possam manifestar a doença de maneira mais branda, muitos experimentam a destruição articular, com deficiências físicas graves e múltiplas comorbidades. As taxas de mortalidade são mais de duas vezes superiores em pacientes com AR que na população geral e esta diferença está aumentando (CARMONA *et al.*, 2010; CHOY, 2012).

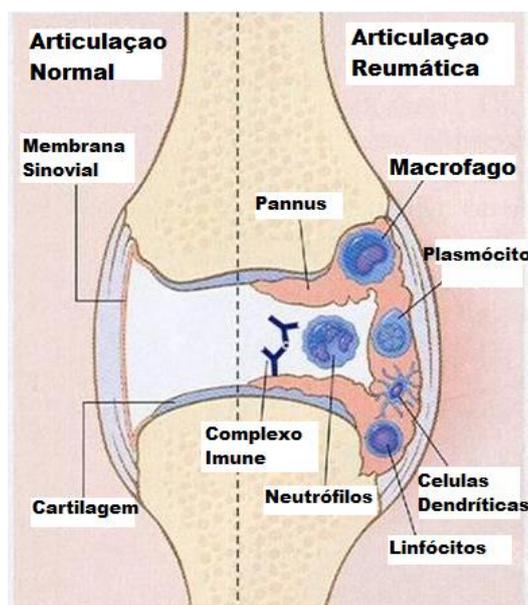
Poucos estudos epidemiológicos na América Latina, especialmente no Brasil, estimam a prevalência das doenças reumáticas (SENNA *et al.*, 2004). Estudo multicêntrico brasileiro em amostras populacionais das macrorregiões do país norte, nordeste, centro-oeste e sul encontrou prevalência de até 1% da população adulta, correspondendo a uma estimativa de 1.300.000 pessoas acometidas (MARQUES *et al.*, 1993; SENNA *et al.*, 2004). Segundo estudos de DAVID *et al.* (2013) estima-se que a incidência de AR seja de 13,4 casos/100.000 habitantes/ano. No que se refere ao gênero é mais comum no feminino cerca de 3:1 mulheres em relação aos homens ocorrendo em todos os grupos étnicos e principalmente na faixa etária da 4ª a 6ª década de vida. Há evidências de fator hereditário o qual varia de 2% a 12% em parentes de primeiro grau dos pacientes, aumentando para 12 - 30% em gêmeos monozigóticos e 5 - 10% em

gêmeos dizigóticos do mesmo sexo desenvolverem a doença (PERRICONE *et al.*, 2011).

2.1.2. Desenvolvimento imune da AR

A fisiopatologia da AR caracteriza-se pela proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora se desconheça o evento desencadeador exato (KINGSLEY, 2009), está envolvido um processo de estimulação do sistema imune e processos de citrulinação de alguns peptídeos como arginina, filagrina, vimetina (MCINNES, SCHETT, 2011), que irão estimular células de defesa como os linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas de MHC apropriadas. Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, o que caracteriza aquecimento durante o processo inflamatório, acúmulo de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento do pannus invasivo e de rápido crescimento (figura 1) (SCHETT; GRAVALLESE, 2012). O crescimento do *pannuns* (infiltrado inflamatório), invade a cartilagem sinovial, ativando os condrócitos e liberando enzimas proteolíticas que irão degradar a cartilagem e a matriz óssea local, resultando em erosões e destruição articular (GOLDRING *et al.*, 2013).

Figura 1: Características fisiopatologia presentes na AR.



Fonte: Adaptado e traduzido de David *et al.*, 2013.

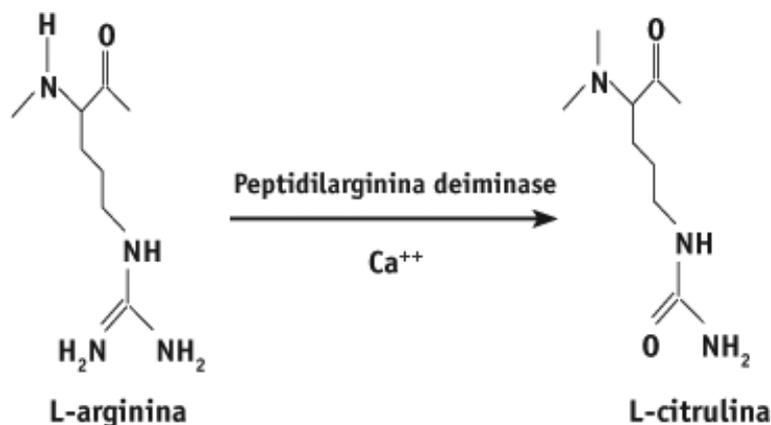
Evidências sinalizam que a presença do anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico (Anti-PCC) antecede o início dos sintomas da AR, e que altas concentrações na corrente sanguínea determina uma doença mais grave com maior desenvolvimento de erosões ósseas (BOISSIER *et al.*, 2012; SCHETT & GRAVALLESE, 2012).

2.1.3 Marcadores da AR

Dentre os marcadores da AR o primeiro a ser descrito foi o Fator Reumatóide (FR) por Waller em 1940 (SCOTT *et al.*, 2010), porém atualmente o FR não é considerado um marcador específico para o diagnóstico de AR, embora está estabelecido como um dos critérios para classificação da AR pelo American College of Rheumatology (ACR). O FR é encontrado em 70% a 90% dos pacientes reumatóides (INGEGNOLI, CASTELLI, GUALTIEROTTI, 2013). Entretanto, está presente em, aproximadamente, 33% dos pacientes na fase inicial da doença. Sua especificidade é de 59% a 65% podendo ser encontrado em outras condições clínicas como a Hanseníase, Doença de Chagas, Lupus Eritematoso Sistêmico, Esclerose Sistêmica, Polimiosite, algumas neoplasias e em uma pequena parcela de indivíduos saudáveis, principalmente, em idosos (MUHAMMAD SAFEER, *et al.*, 2011).

A busca por marcadores diagnósticos alternativos eficazes para o diagnóstico da AR levou também a descoberta dos auto-anticorpos antiperinuclear (APF), antiqueratina (AKA) e antifilagrina, porém o APF e o AKA nunca se tornaram testes de diagnóstico adotados na rotina dos laboratórios devido a suas baixas sensibilidade e especificidade. Entretanto, pesquisas demonstraram que ambos auto-anticorpos reconhecem como antígeno formas de uma molécula intracelular conhecida como filagrina, a qual contém o aminoácido citrulina, este que é um aminoácido não-codificado, gerado por uma modificação pós-tradução de proteínas (VOSSENAAR *et al.*, 2003), mediada pela enzima peptidil-arginina deiminase (PAD) (Figura 2). Este processo ocorre naturalmente durante uma variedade de processos biológicos, incluindo a inflamação e a apoptose (INSTITUTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DE SANTOS, 2002; VOSSENAAR e VAN VENROOIJ, 2004).

Figura 2: Citrulinização (deaminação) da peptidilarginina pela PAD; O grupo guanidino da arginina é hidrolisado produzindo um grupo ureido e amônia.



Fonte: Adaptado de VOSSENAAR e VAN VENROOIJ, 2004

Com a produção da citrulina, há a estimulação do sistema imune e produção de anticorpos contra o peptídeo cíclico citrulinado (Anti-PCC). Este anticorpo 1 é encontrado em 70 a 90% dos doentes com AR e têm uma especificidade elevada para a doença (90 a 95%) (SUZUKI, *et al.*, 2003).

O peptídeo cíclico derivado da filagrina é utilizado como substrato antigênico no teste em alguns outros testes como o peptídeo cíclico citrulinado, o qual é derivado de seqüências de filagrina (MAJKA *et al.*, 2008). O Anti-PCC não possui apenas alta especificidade, mas também têm alto valor preditivo para a progressão erosiva da doença e apresentam, portanto, valor de prognóstico (VOSSENAAR e VAN VENROOIJ, 2004).

2.1.4 Diagnóstico do Anti-PCC

O diagnóstico precoce da AR é muito importante para que o clínico possa intervir adequadamente evitando os danos irreparáveis na articulação e estabelecer terapias adequadas. São claros os benefícios da terapia iniciada no período que antecede as manifestações clínicas da doença, uma vez que a detecção precoce da AR e a intervenção terapêutica são elementos chave na prevenção de danos nas articulações,

inclusive nos pacientes que apresentam FR (Fator Reumatoide) negativo, teste este utilizado como triagem para a doença (SMOLEN *et al.*, 2010).

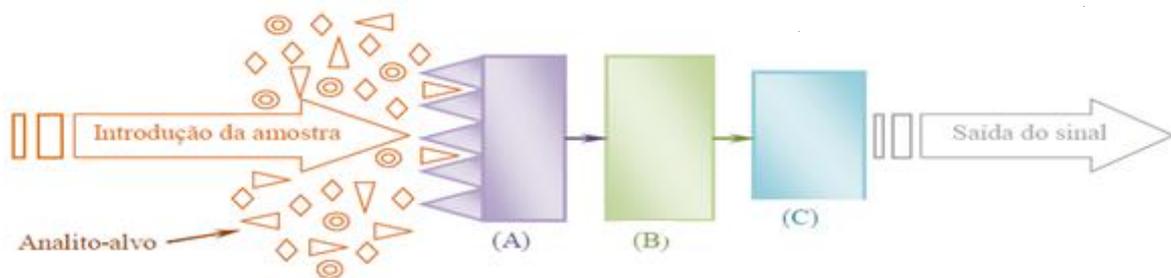
Neste contexto, diversos estudos têm relatado a especificidade dos anticorpos Anti-PCC para o diagnóstico da AR em períodos de desenvolvimento da doença, inclusive naqueles mais iniciais (ORBACH e FORSLIND *et al.*, 2004). Além disso, a presença do anticorpo Anti-PCC com a progressão erosiva da doença, ou seja, a presença do anticorpo Anti-PCC em títulos altos poderia representar uma forma da doença mais agressiva. Este anticorpo, portanto auxilia no planejamento da estratégia terapêutica (VOSSENAAR e VAN VENROOIJ, 2004).

De acordo com a literatura, anticorpos Anti-PCC podem ser detectados até 14 anos antes do surgimento dos primeiros sintomas da AR. Deste modo, pode-se prever que o paciente Anti-PCC positivo irá desenvolver AR em algum estágio de sua vida, desta forma o Anti-PCC tem capacidade de indicar o desenvolvimento futuro da AR (SONG & KANG, 2010).

2.2 Biossensores

Biossensores são descritos como dispositivos analíticos que integram um elemento biológico e um elemento transdutor físico-químico. Estes produzem um sinal elétrico proporcional à presença e/ou concentração de um ou múltiplos analitos existentes numa amostra (HOLFORD, DAVIS & HIGSON, 2012). Portanto, são dispositivos capazes de detectar a presença de um analito, gerando um elétrico mensurável e quantificável (figura 3). Um biossensor deve ser um dispositivo de fácil utilização, rápido a fornecer informações, sensível e preciso. (TOTHILL, 2009).

Figura 3: Esquema básico de um biossensor: A) Elemento de reconhecimento, B) Transdutor, C) Unidade de processamento de sinal.

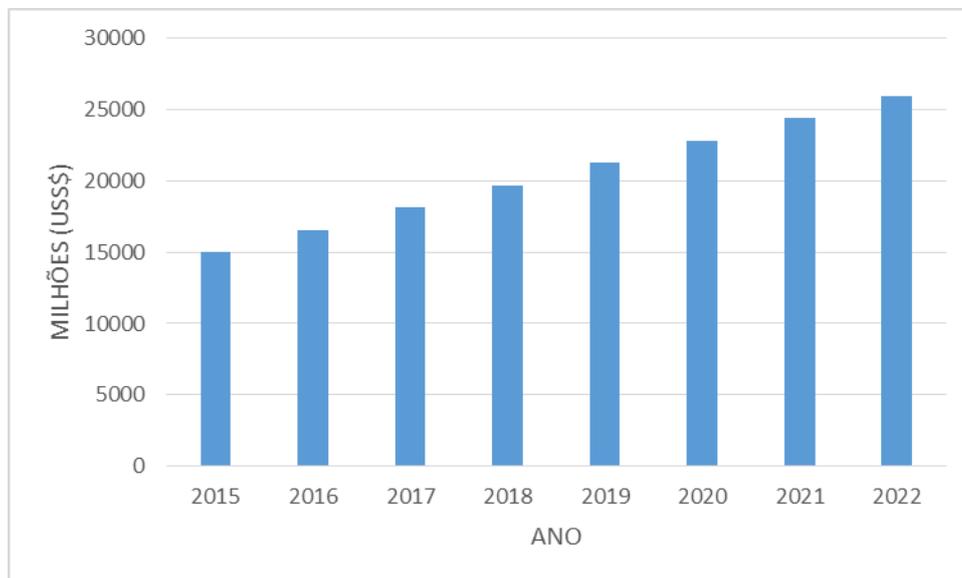


Fonte: Adaptado Calil, 2011.

Os biossensores permitem que os procedimentos de imunoenaios alcancem um novo patamar. Tornando possível mudanças significativas na forma de realizar as análises, simplificando o procedimento analítico com resultados seguros e rápidos (DURAND, *et al.*, 2008).

Silva-Jr (2016) estima que os biossensores irão movimentar o mercado financeiro, podendo ultrapassar a marca de US\$ 14 bilhões em sete anos (2015 a 2022) (Figura 4). Estas receitas foram estimadas a crescer com um CAGR (Crescimento Composto Anual) de 11,5% entre 2015 e 2022. Grande parte deste crescimento está relacionado ao aumento na demanda das áreas de segurança, monitoramento ambiental, segmento de diagnóstico do tipo *homecare*. Na área acadêmica, até 2015, as publicações envolvendo biossensores ultrapassaram os 14.000 artigos. As previsões até 2022 sugerem que esta tendência de crescimento irá continuar com destaque para os biossensores do tipo pronto-atendimento (do inglês – “*point-of-care*” (POC)).

Figura 4: Expansão esperada para o mercado de biossensores previsto por CARG de 2015 a 2022 (SILVA-JR, 2016).



Fonte: SILVA-JR, 2016.

Os biossensores podem ser caracterizados pelo tipo de biomolécula que identificam e também pelo tipo de transdutor. O transdutor consiste no componente capaz de gerar um sinal e transformá-lo em um parâmetro mensurável. Os transdutores são classificados: 1) Eletroquímicos os quais são baseados em propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, impedância elétrica, (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos); 2) Piezelétricos que são baseados nas análises das variações de frequência geradas pelas oscilações de um cristal (PAVEY *et al.*, 2003); 3) Óticos, como os baseados nos fenômenos de ondas evanescentes (ressonância de *plásmons* de superfície, SPR - *Surface Plasmon Resonance*) (TANG *et al.*, 2006) e 4) Calorimétricos que usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito (CHAUBEY, MALHOTRA, 2002).

Dentre os diversos tipos de transdutores, os eletroquímicos oferecerem vantagens como: simplicidade, rapidez na resposta, menor custo, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação de sensores portáteis, tendo sido bastante explorado para a abordagem “point-of-care” (HE *et al.*, 2009).

2.2.1 Imunossensores eletroquímicos

Os Imunossensores eletroquímicos são dispositivos baseados na reação de interação antígeno e anticorpo, os quais são imobilizados sobre a superfície transdutora.

Estes sensores vêm ganhando crescente atenção, por combinarem alta especificidade dos tradicionais métodos de imunoenensaio, com baixos limites de detecção e custo reduzido do sistema de medição eletroquímica. O modo mais comum destes sensores é a configuração de um ensaio do tipo “sanduíche”. Este pode ser realizado pela imobilização do anticorpo (Ac) ou antígeno (Ag) sobre a superfície sensora e, após a reação específica com o antígeno ou anticorpo correspondente, e por fim pode ser adicionado um anticorpo ou antígeno conjugado a uma enzima para que ocorra o monitoramento da reação enzimática ou catalítica com o substrato correspondente. Estes ensaios são conhecidos como do tipo sanduíche e possuem uma alta sensibilidade e especificidade, uma resposta linear para um intervalo de concentração considerável (SADIK, ALUOCH & ZHOU, 2009).

A característica principal da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre os componentes estruturais tridimensionais das duas moléculas. Esta complementaridade concede a aproximação máxima entre os sítios de ligação das moléculas de epítomos dos antígenos. As forças de interação entre as moléculas no complexo antígeno-anticorpo podem ser por ligações não-covalentes como Van der Waals, ligações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio (LUPPA *et al.*, 2010). A dissociação do complexo antígeno-anticorpo é reversível podendo ser feita por diferentes processos calor, modificação do pH, força iônica e solventes orgânicos (LIN, WEI & CHU, 2012).

A molécula do anticorpo é composta pelo fragmento F (Ab) que possui o grupo amino terminal, o qual interage com o sítio de ligação do antígeno, e uma fração constante (Fc) que não interage com epítomos do antígeno. Portanto, ao tornar possível a imobilização pela fração Fc, permite-se uma orientação adequada do anticorpo imobilizado obtendo-se sítios ligantes direcionados para regiões de interações antigênicas, às quais permitem ligações bastante específicas (CHAI *et al.*, 2008)

2.2.2 Aplicação de nanomateriais aos imunossensores

Os nanomateriais (nanopartículas metálicas, quantum dots, dendrímeros, entre outros) são capazes de aumentar a área eletrocatalítica dos sensores, proporcionando o aumento na transferência de elétrons. A funcionalização dos nanomateriais é interessante para imobilização de biomoléculas (SHI *et al.*, 2007). Diversos tipos de nanoestruturas de carbono têm se destacadas para aplicação em imunossensores, como os nanotubos de carbono, fulerenos, grafite, em particular o grafeno e suas formas modificadas são considerados como um dos nanomateriais mais emergentes na área eletroquímica e eletroanalítica (GUNLYCKE, *et al.*, 2010), devido as suas excelentes propriedades físicas e químicas, como: alta velocidade de transferência de elétrons e facilidade de síntese sobre inúmeras superfícies (ATES, 2013).

2.2.3 Grafeno

O grafeno é um material 2D, de espessura atômica, formado por átomos de carbono com hibridização sp^2 , ligados entre si em forma hexagonal (figura 5) em estrutura similar a uma colmeia (MEHL, *et al.*, 2014). O isolamento, caracterização e identificação do grafeno foi realizado pela primeira vez em 2004, por meio de etapas sucessivas de esfoliação de um pedaço de grafite, utilizando-se fitas adesivas comerciais (NOVOSELOV *et al.*, 2004).

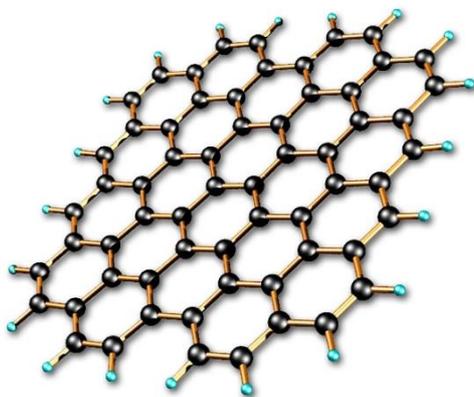
Atualmente, tem-se utilizado o termo grafeno de maneira ampla, abrangendo não só o material original (formado por uma única folha com espessura monoatômica), mas também a uma família de materiais formados por duas, três, quatro folhas de grafeno empilhadas de forma organizada. O grafeno é o mais novo membro da família dos alótropos de carbono (que conta com o diamante, fulerenos, grafite e nanotubos de carbono, além da grande variedade de materiais conhecidos como carbono amorfo, vítreo, etc.), com aproximadamente 10 anos de existência, e já é considerado um material altamente estratégico, com inúmeras possibilidades reais de aplicações (ZHOU *et al.*, 2010).

O método mais utilizado para produção do grafeno na atualidade é baseado na oxidação (química ou térmica) de porções de grafite formando o óxido de grafite (GO). As porções oxigenadas presentes nesse material tornam o GO produzido mais fácil de

ser disperso em água (KRISHNAMOORTHY & VEERAPANDIAN, 2013). Estas dispersões posteriormente são reduzidas utilizando-se diversos agentes redutores (hidrazina e o borohidreto de sódio) (SHIN, *et al.*, 2009). Após a redução o produto formado é denominado grafeno, ou mais especificamente, óxido de grafeno reduzido (GOr). O GOr tem sido amplamente utilizado por melhorar condutividade, e devido às suas características estruturais são de grande interesse para produção de nanocompósitos, (YAO *et al.*, 2012) e poder ser utilizado em aplicações em sensores eletroquímicos, tais como sensores ambientais, sensores enzimáticos (CHUNG *et al.*, 2013) e criação de dispositivos munossensores “point-of-care” (ZHOU *et al.*, 2010). Esta popularidade pode ser atribuída ao GOr possuir maior área superficial que o GO e os nanotubos de carbono, o que lhe proporciona ótimas características de condução electrocatalítica e aumento dos picos de corrente (PUMERA *et al.*, 2010).

Segundo a literatura atual o GOr tem sido usado principalmente na criação de imunossensores para a detecção de marcadores de câncer e outras doenças, como imunossensores para detecção de gonadotrofina coriônica humana - um marcador principal para a gravidez, que também pode indicar alguns tipos de tumores, com um limite de detecção de $0,62 \text{ ng mL}^{-1}$ (TEIXEIRA *et al.*, 2014), imunossensor para antígeno carcino embrionário (CEA) com limites de detecção de $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ (TANG *et al.*, 2011) e $10,0 \text{ pg mL}^{-1}$ (ZHANG *et al.*, 2010); sensores biomiméticos para troponina T, marcador de infarto agudo do miocárdio, com limite de detecção de $0,006 \text{ ng mL}^{-1}$ (SILVA *et al.*, 2016) .

Figura 5: Representação estrutural do grafeno.

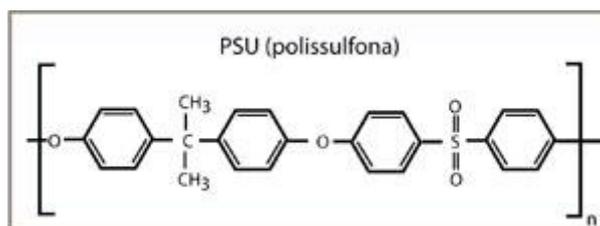


Fonte: Adaptado ANOTA, 2009.

2.2.4 Polissulfona

A polissulfona [poli(oxi-1,4-fenilenosulfonil)-1,4-fenilenooxi-1,4-fenileno(1-metiletilideno)-1,4-fenileno] é um polímero de característica predominantemente amorfa (Figura 6). Possui elevada resistência química, resistindo aos ácidos, álcalis e eletrólitos em variação de pH de 2 a 13, mecanicamente, a polissulfona tem alta resistência à compressão. Este polímero é conhecido por sua robustez e estabilidade a altas temperaturas, resistente a agentes oxidantes, permitindo ser limpo com clareadores, por exemplo, cetonas e hidrocarbonetos clorados e aromáticos (MISTRY, 1996; PARK, *et al.*, 2005).

Figura 6: Representação estrutural da Polissulfona.



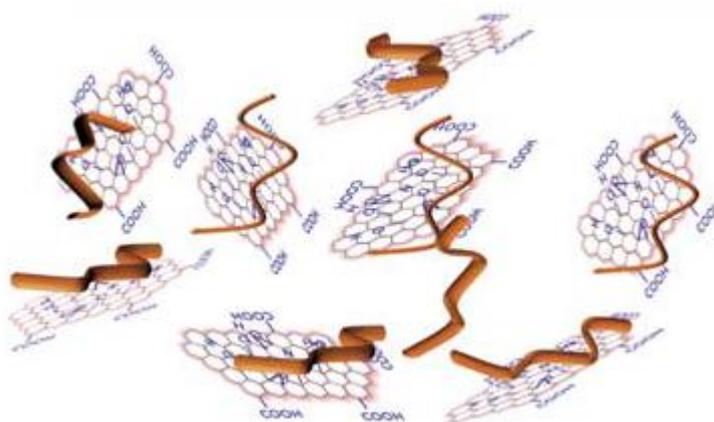
Fonte: Adaptado ANDRADE, 2014.

A polissulfona tem sido utilizada em diversas aplicações químicas (Edwards *et al.*, 2002), tais como membrana para filtração, processos têxteis, produção de materiais para construção civil, entre outras. Sua primeira aplicação no campo dos biossensores foi em 2007 (SANCHEZ, PUMERA, FABREGAS) em um imunossensor eletroquímico para detecção de imunoglobulinas G (IgG). Neste trabalho, a membrana de PSF foi agregada a nanotubos de carbono, os quais imobilizaram anticorpos anti-IgG, possibilitando alcançar limites de detecção na ordem de 1,6 µg/mL de IgG. No mesmo ano, o grupo experimentou a utilização da membrana de polissulfona agregada ao grafite, resultando em um limite de detecção de 0,77 µg/mL, (SANCHEZ, PUMERA, FABREGAS, 2007).

2.2.5 Grafeno com polissulfona

Nos últimos anos, os compósitos de polissulfona e nanoestruturas de carbono têm chamado atenção por sua alta biocompatibilidade permitindo o desenvolvimento de novas aplicações biomédicas, tais como próteses, entrega de medicamentos, vacinas e biossensores. Este compósito pode prover aos sistemas usados uma grande estabilidade química, térmica, mecânica e hidrofobicidade (NUNES & PEINEMANN, 2006). Assim, este pode ser usado em altas temperaturas, já que tem uma temperatura de transição vítrea de 195 °C e tem uma ampla faixa de pH (2 - 13), embora estes sejam solúveis em solventes orgânicos pouco polares como dimetilformamida e clorofórmio. Um esquema provável do nanocompósito GOr-PSU (Figure7) foi idealizado por JIN *et al.* (2013).

Figura 7: Representação esquemática de grafeno com polissulfona.



Fonte: Adaptado de JIN *et al.*, 2013.

Devido as já mencionadas características atrativas do nanocompósito GOr-PSU associadas a alta estabilidade em diferentes condições de pH, atividade eletrocatalítica e capacidade de imobilizar moléculas biológicas por possuir grupos carboxílicos reativos, este é, portanto, interessante para aplicação em biossensores eletroquímicos.

2.3- Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo. A eletroquímica pode favorecer opções viáveis para mediar problemas na construção de novos métodos para o diagnóstico clínico. Uma das vantagens é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas, além do fácil controle de variáveis que combinadas de formas diversas levam a técnicas eletroquímicas particulares, tais como: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ), voltametria de pulso diferencial (VPD) (BRETT & BRETT, 1993) dentre estas, a voltametria cíclica teve destaque neste trabalho.

2.3.1 Voltametria Cíclica

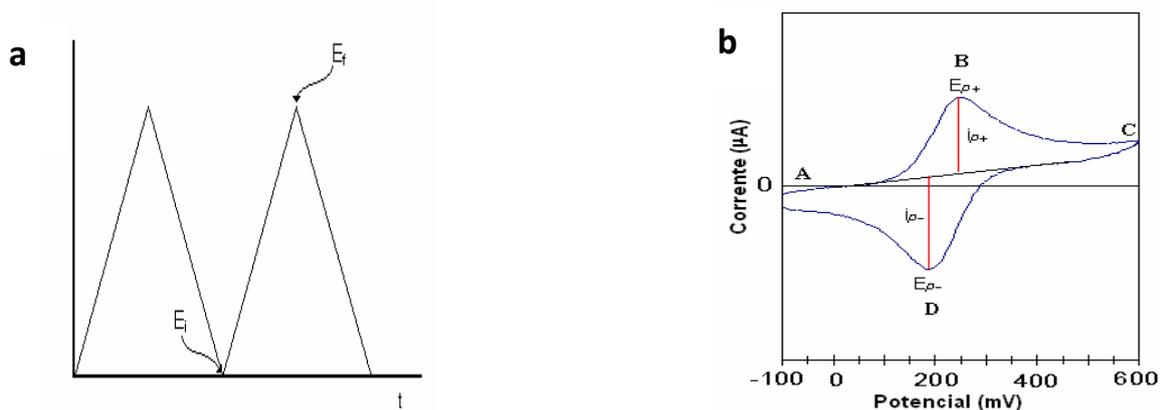
A VC é um conjunto de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre o analito são mensuradas através de variações de corrente resultantes de reações de redução e oxidação durante a aplicação de uma diferença de potencial. Nesse processo é gerado uma corrente relacionada a alterações dos eletrodos após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes faradáicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox de espécies eletroativas (BARD & FAULKNER, 2006; BRETT & BRETT, 1993). Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

A resposta em corrente, na VC pode ser obtida quando o eletrodo de trabalho é submetido a uma onda triangular de potencial, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo (Figura 8 (A)), partindo de um valor inicial até um final. Como resultado, é gerado um gráfico de corrente em função da variação do potencial, denominado voltamograma cíclico (Figura 8 (B)). Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons. Para uma reação reversível, as I_{pa} e I_{pc} são aproximadamente iguais em valor absoluto, a diferença entre os E_p é aproximadamente 59 mV e E_p é independente da velocidade de varredura. Já nos sistemas irreversíveis observa-se uma

completa ausência de picos de oxidação e redução reversos e deslocamentos do E_p em relação à velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

A VC pode ser utilizada para caracterização estudos de modificação da superfície sensora, detalhando importantes informações do sistema, tais como potencial de oxidação e redução da espécie, número de elétrons transferidos, reversibilidade da reação, coeficiente de difusão, entre outros (BRETT & BRETT, 1993).

Figura 8: Técnica de VC. (a) Relação potencial-tempo e (b) Resposta de corrente obtida da perturbação aplicada.



Fonte: Adaptado de GREEF *et al.*, 1985.

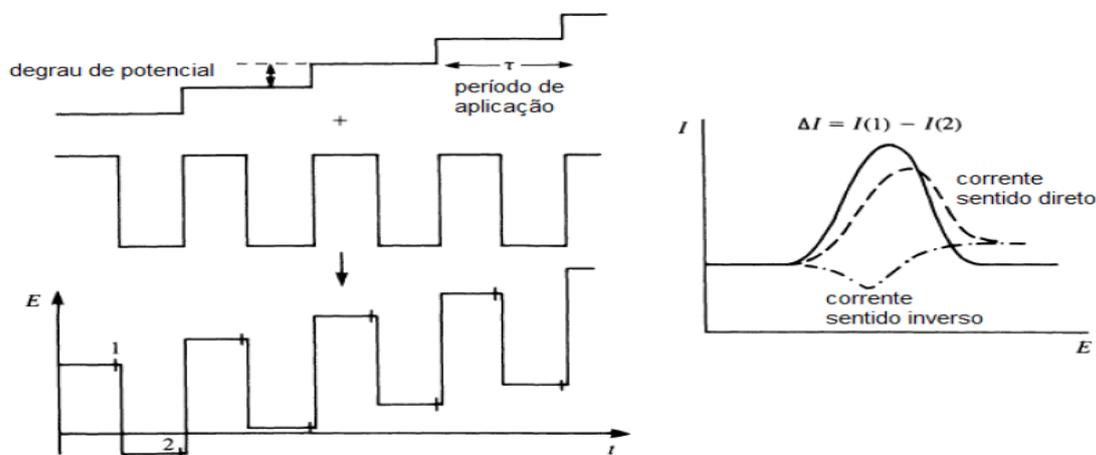
2.3.2 Voltametria de Onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada (do inglês, square-wave), uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (staircase) caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura a e período τ é aplicada ao eletrodo de trabalho, como representado na figura 9. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso (que ocorre no meio do degrau da onda staircase), onde a

direção do pulso é contrária à direção da varredura. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida (SCHOLZ, 2010).

O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado. Na figura 9 está também representado o pico de corrente resultante da VOQ, onde o pico é caracterizado por um potencial e largura W . A sensibilidade desta técnica é comparável com aquela proveniente da voltametria de pulso diferencial. A maior vantagem desta técnica é a velocidade de aquisição dos dados. Frequências de ciclos de onda quadrada por segundo permitem o uso de velocidades de varredura de potenciais extremamente rápidas. Enquanto na voltametria de pulso diferencial a velocidade de varredura varia de 1 a 10 mV s^{-1} , na VOQ esta velocidade varia de 100 a 1000 mV s^{-1} , isto diminui o tempo de análise de cerca de 3 a 5 minutos para poucos segundos (3 a 10 s) sem haver perda da resolução dos picos (VASSOS, EWING, 1983).

Figura 9: Representação esquemática da voltametria de onda quadrada.



Fonte: Adaptado de GREEF *et al.*, 1985.

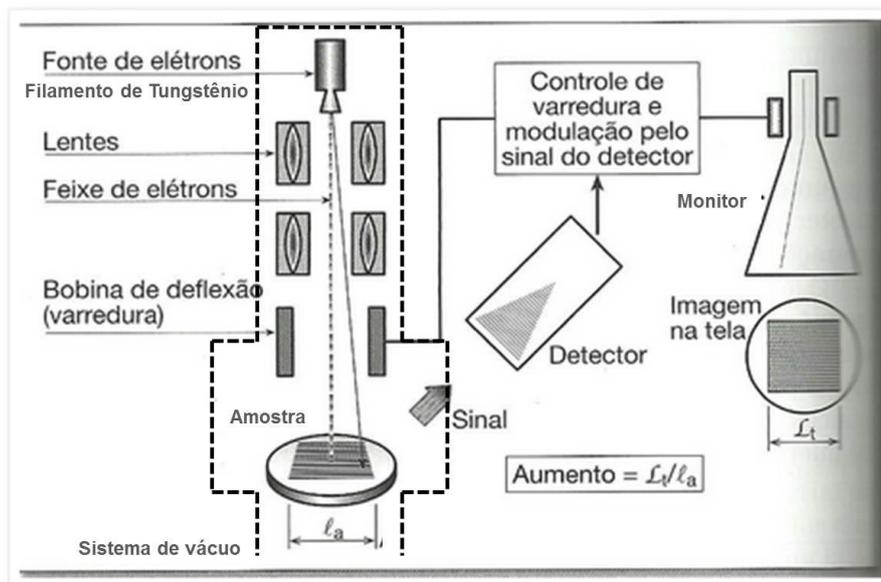
2.4 Caracterização morfológica

2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais

de materiais sólidos, fornecendo com grande rapidez informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos da amostra. As imagens são obtidas com alta resolução, geralmente valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1nm. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; POWER *et al.*, 2014). O MEV convencional é basicamente composto por uma coluna óptico-eletrônica adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, sistema de detectores e sistema de vácuo (Figura 10).

Figura 10: Esquema de funcionamento do MEV.



Fonte: Adaptação de COLPAERT, 2008.

O princípio do funcionamento do MEV consiste na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, produzido na coluna óptico-eletrônica, para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, localizado no canhão eletrônico, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. A interação do feixe com a amostra produz

elétrons e fótons, que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

3. OBJETIVO

3.1. Geral:

Desenvolver imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpo antipeptídeo citrulinado (Anti-PCC),

3.2. Específicos:

- Modificar a superfície do Eletrodo de carbono vítreo com GOr-PSU;
- Caracterizar as respostas eletroquímicas através da técnica de Voltametria Cíclica e onda quadrada;
- Desenvolver uma plataforma sensora empregando GOr-PSU, visando a aplicação em imunoenaios eletroquímicos;
- Realizar testes de imobilização dos anticorpos Anti-PCC, para a avaliação da funcionalidade do filme formado;
- Realizar caracterização morfológica das superfícies modificadas;
- Estabelecer a curva analítica do imunossensor para detecção do Anti-PCC em amostras preparadas em tampão;
- Avaliar a especificidade do sistema sensor frente a anticorpos policlonais inespecíficos.

4. METODOLOGIA

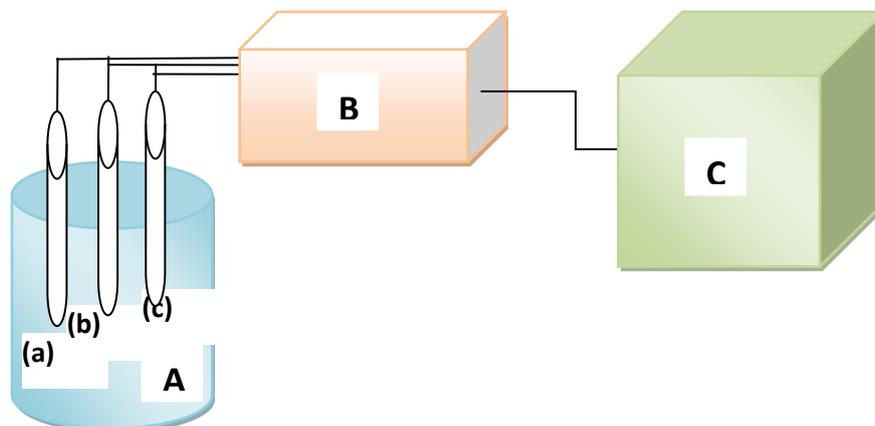
4.1 Reagentes

Antígenos de citrulina e anticorpos anti-peptídeo citrulinado foram adquiridos da Calbiochem (EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), glicina adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). Grafeno-polissulfona (GOR-PSU) foi sintetizado pelo método de Hummers. Clorofórmio foi obtido da VETEC (BRA). O tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,4) foi utilizado em todos os experimentos para diluição das amostras biológicas. Este foi preparado dissolvendo-se 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,24 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) e 1,44 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), todos obtidos da VETEC (BRA), em 1L de água deionizada. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada ultra pura obtida através de sistema Millipore Milli-Q® (EUA) com resistividade maior que 18 M Ω /cm. Os reagentes químicos utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico.

4.2 Equipamentos

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato modelo PalmSens (PalmSens BV, HOL) conectado a um microcomputador com software PSTrace soft, para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados (Figura 11). Para tais experimentos, foi empregada uma célula eletroquímica convencional de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade de 20 mL e tampa de policloreto de vinila. Utilizando-se um sistema trieletródico composto por: um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com área de 0,5 mm²; um eletrodo de fio de platina helicoidal; um eletrodo de Ag/AgCl imerso em solução de KCl saturado (3,0 M), utilizados como eletrodo de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente, adquiridos da Microquímica (BRA).

Figura 11: Desenho esquemático do aparatos experimentais utilizados. A – Célula eletroquímica representando os 03 eletrodos: (a) de Referência, (b) de Trabalho e (c) Auxiliar; B – Potenciostato; C – Microcomputador.



Fonte: SILVA JR, 2016.

4.3. Caracterização Morfológica

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Neste trabalho, para caracterização das amostras, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV), Jeol modelo JSM 5900 com filamento de tungstênio. As análises morfológicas foram realizadas utilizando sinal de elétrons secundários e tensão de 10 – 25 kV decorrente do feixe de elétrons primários. A superfície dos ECVs foram previamente polidas com alumina de 0,5 μm e 0,3 μm . Posteriormente, foi depositado sobre as superfícies do ECV as amostra de GOr-PSU e em outra superfície GOR. E levadas a um dissecador, durante 24 h para remoção de umidade e evaporação de resíduos do solvente utilizado na dispersão das amostras. Após a deposição as amostras foram metalizadas com ouro, sendo utilizado o *Sputter Coater* da BalTec modelo SCD-05, com o qual foi depositado uma camada de 20 nm de ouro, em atmosfera inerte de argônio por aproximadamente 5 minutos.

4.4 Preparação do eletrodo de trabalho

4.4.1 Limpeza da superfície de trabalho

O ECV foi submetido a um procedimento mecânico de limpeza. Esta etapa consistiu no polimento da superfície do ECV com alumina de granulometria de 0,5 μm durante 2 minutos, em seguida repetiu-se o procedimento com alumina de granulometria de 0,3 μm e por fim a superfície foi submetida a lavagem com jato de água ultrapura.

Subsequentemente da limpeza, foi analisado o ECV por VC em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 M). Observando o perfil dos picos redox do eletrodo. O voltamograma resultante foi utilizado como modelo padrão para as leituras subsequentes. Assim, verificou-se as modificações da interface sensora, através das variações das correntes de oxidação e redução do ECV (após limpeza) e ECV modificado com GOr-PSU.

4.4.2 Construção e parâmetros do filme de grafeno com polissulfona

Três diferentes solventes foram testados como agente dispersante do GOr-PSU no intuito de se encontrar o melhor solvente. Logo foram feitas as seguintes dispersões: 1mg de GOr-PSU em 1 mL de clorofórmio, 1mg de GOr-PSU em 1 mL de água, 1mg de GOr-PSU em 1 mL de dimetilformamida. Todas as amostras foram submetidas a banho ultrassônico por 2h.

A obtenção do filme de GOr-PSU sobre a superfície do ECV foi realizada pelo processo de *drop coating* com 3 camadas (alíquotas de 10 μL) seguidas por secagem em estufa controlada a 40 °C por 20 min.

4.4.3 Imobilização dos antígenos de citrulina e resposta analítica

Uma alíquota de 10 μL da solução de antígeno citrulina (CCP-Ag) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi depositada sobre a superfície do ECV modificado com GOr-PSU. O ECV foi mantido durante 60 min em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, 10 μL uma solução de glicina (0,005M) foi utilizada como agente de bloqueio de reações não – específicas, por incubação do ECV modificado por 30 min com 10 μL . Posteriormente, o eletrodo lavado com água ultra pura para remoção de moléculas não ligadas covalentemente e, então, obtido o imunossensor.

A resposta analítica foi avaliada incubando-se o imunossensor com soluções de diferentes concentrações de Anti-PCC diluídos em PBS (pH 7,4; 0,01 M). Entre as etapas do imunoensaio, a superfície eletródica foi lavada cuidadosamente com tampão PBS (pH 7,4; 0,01 M) para remover antígenos não ligantes.

4.4.4 Ensaios eletroquímicos

Para caracterização das etapas de imobilização análises por VC foram realizadas em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 mM). Os voltamogramas do ECV foram obtidos na faixa de potencial de -0,2 a 0,6 V a uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

A interação esperada antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo foi monitorada em tempo real, utilizando a técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada (VOQ) para qual foi utilizado uma faixa de potencial de -0,2 a 0,6 V e frequência de 25 Hz. A resposta analítica para citrulina foi obtida pela diferença entre a altura dos picos de corrente (ΔI) da VOQ do ECV com a citrulina em relação ao branco, ou seja, antes da incubação do antígeno de citrulina.

4.5 Otimização dos parâmetros experimentais

4.5.1 Estudo de estabilidade do filme de grafeno com polissulfona

A estabilidade do filme de GOr-PSU foi estudada, realizando-se 20 sucessivas varreduras cíclicas sob o mesmo eletrodo modificado, em uma janela de potencial -0,2 a 0,6 V. Ag/AgCl (KCl Sat.), sob velocidade de varredura de 50 mV/s, em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (50 mM) preparada em KCl (0,1 M) (SILVA *et al.*, 2010). A estabilidade do GOr-PSU no ECV foi avaliada a partir do conhecimento do coeficiente de variação (CV) obtido entre os experimentos.

4.5.2 Influência da velocidade de varredura

Para estudo da resposta analítica do imunossensor na variação da velocidade de varredura, o ECV/ GOr-PSU foi submetido à análises por VC a diferentes velocidades de varredura (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120 mV/s), em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (50 mM) preparada em KCl (0,1M). O comportamento eletroquímico do filme nanoestruturado foi avaliado através da relação dos I_{pa} e I_{pc} vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

4.5.3 Influência da concentração de antígeno citrulina

A influência da concentração dos antígenos de citrulina sobre o desempenho do imunossensor foi investigado. Neste estudo, o ECV/ GOr-PSU foi incubado durante 60 minutos com antígeno citrulina com diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1; 10; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, os eletrodos foram submetidos a análises por VC na mesma faixa de potencial dos estudos anteriores e conduzido em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M).

4.5.4 Curva analítica

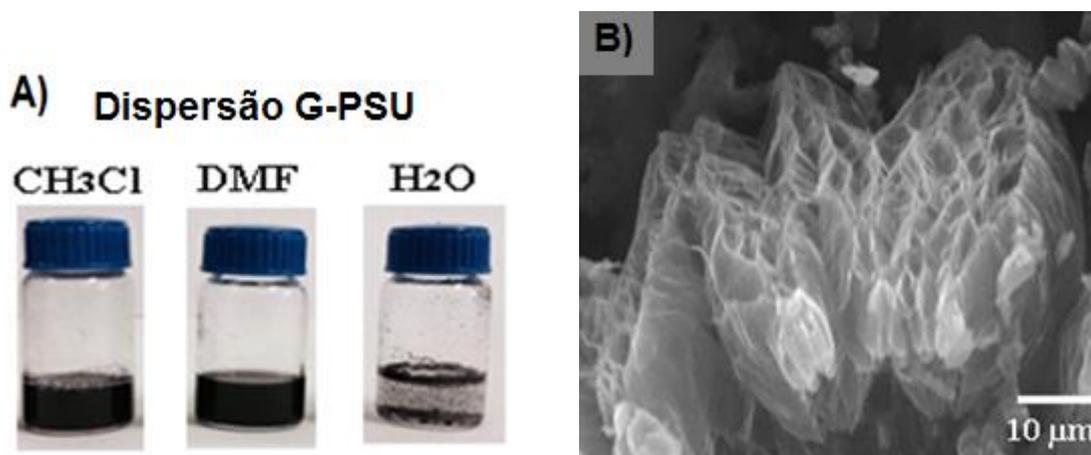
A curva de calibração do imunossensor proposto para as diferentes concentrações de Anti-PCC foi verificada utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Para tais experimentos, sucessivas adições de amostras de Anti-PCC, preparadas em tampão PBS (0,01M, pH 7,4), foram pipetadas sobre a superfície do ECV/ GOr-PSU /CCP-Ag/Glicina e mantidas durante 30 min. As medidas de corrente do ECV/ GOr-PSU /Glicina foram consideradas como controle no estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica

Pode-se observar as dispersões do GOr-PSU em diferentes substâncias (Figura 12 (A)) em água (H_2O), dimetilformamida (DMF) e cloroformio (CH_3Cl), nota-se que o GOr-PSU não se dispersa em água devido as características hidrofóbicas, porém em cloroformio e dimetilformamida o GOr-PSU se dispersa bem, isso pode ser visualizado por se apresentarem em uma distribuição negra e homogênea. Então foi escolhido como dispersante o clorofórmio por ser altamente volátil e não deixar resíduos no nanocompósito. Na MEV do GOr-PSU em pó (Figura 12 (B)) , observa-se uma distribuição uniforme de uma estrutura porosa (ou esponjosa), característica comum ao polímero polissulfona.

Figura 12: Dispersão da GOr-PSU e caracterização da GOr-PSU: A) Dispersões de GOr-PSU em água, DMF e clorofórmio; B) GOr-PSU em pó.

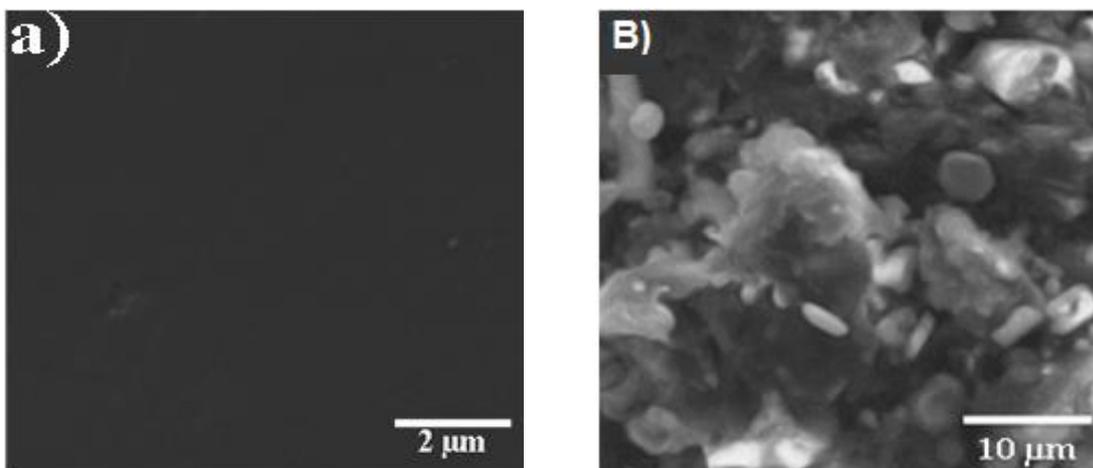


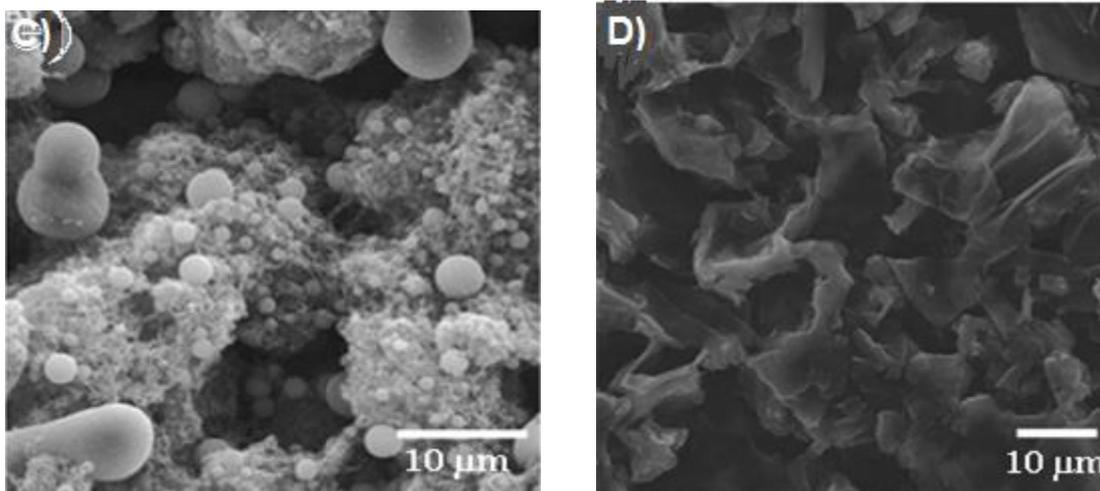
Fonte: SILVA JR, 2016.

As imagens de MEV foram utilizadas para caracterização da superfície do ECV antes e após modificação com GOr-PSU (Figura 13). A superfície do ECV limpo foi caracterizada por uma superfície lisa (Figura 13 (A)) . O GOr-PSU usado neste trabalho foi comparado com outros nanocompósitos (nanotubo de carbono e grafite) reportados na literatura tais como grafite-polissulfona e nanotubos de carbono/polissulfona. Observando-se que existe uma melhora no GOr-PSU, porém no caso do grafite-polissulfona (Figura 13 (B)) (ÒRDONEZ & FÁBREGAS, 2006)

observa-se estruturas na forma de grânulos com falta de homogeneidade, diante do que ocorre no processo da polimerização com polisulfona, não é possível recobrir completamente o material de carbono tipo *bulk* (grafite) de forma contínua. Para o caso dos nanotubos de carbono/polissulfona (Figura 13 (C)) (PUMERA, SANCHEZ, FABREGAS, 2007), estes apresentam estruturas arredondadas e outras esponjosas e pouco homogêneas, esse arranjo pode se dar pelo fato de que os nanotubos de carbono tenham sido pouco dispersos ou não recobrem toda a superfície pelo processo de polimerização, assim se atribui que o MEV do GOr-PSU (Figura 13 (D)) utilizado neste trabalho, apresenta uma distribuição regular, devido às folhas de grafeno possuírem alta área superficial, o que favorece ao processo da polimerização com polisulfona de forma direta, o que melhora as propriedades de condutividade e atividade eletrocatalítica, já que no presente conglomerado a difusão de elétrons pode ser interrompida. Além disso apresentar nanoestruturas tipo porosas que favorecem a imobilização de biomoléculas, tornando o nanocompósito por GOr-PSU um nanocompósito ideal para produção de plataforma sensoras, tendo em vista o aspectos de uma superfície como atividade electrocatalítica.

Figura 13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície de eletrodo de carbono vítreo modificado. A) ECV não modificado; B) Grafite-polissulfona sobre ECV; C) NTC/polissulfona sobre ECV; D) GOr-PSU sobre ECV.





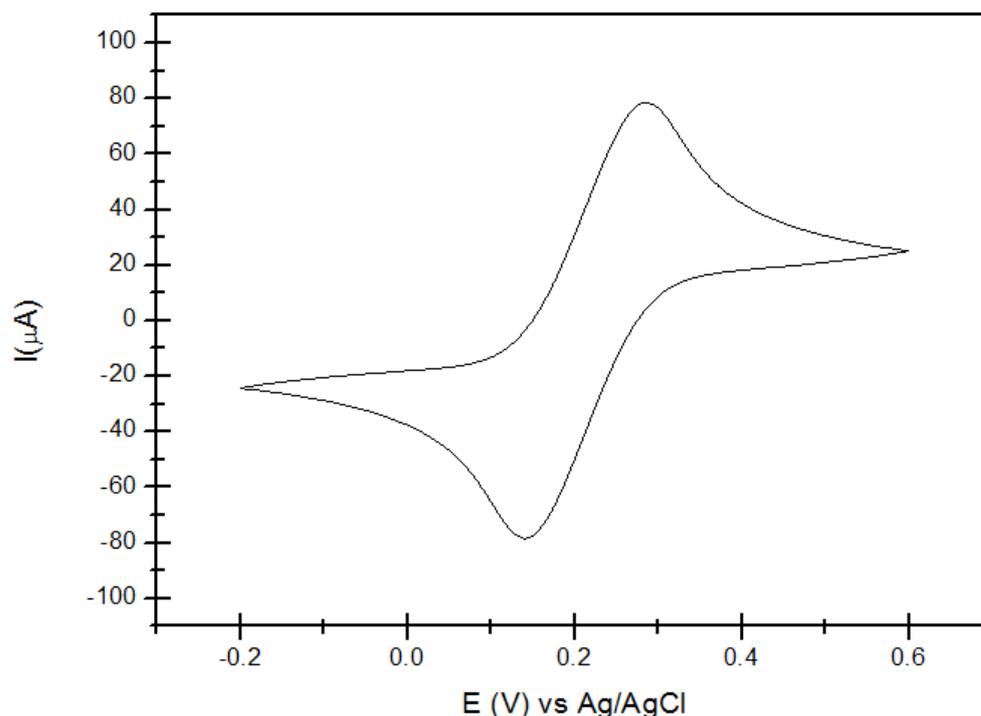
Fontes: A) e D) Fonte: SILVA JR, 2016

B) adaptado ÒRDONEZ & FÁBREGAS, 2006; C) adaptado PUMERA, SANCHEZ, FABREGAS, 2007.

5.2 Limpeza da superfície sensora

A limpeza da superfície do ECV foi confirmada através do perfil eletroquímico analisado nos quais os picos anódicos (I_{pa}) e picos catódicos (I_{pc}) da solução aquosa de $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$ sendo padronizado o $\Delta V < 80$ mV razão de I_{pa} por I_{pc} de aproximadamente 1 (Figura 14) por (VC) em um sistema trieletródico onde para tal foi realizado testes em triplicatas onde se obteve um desvio padrão de 2.14% de I_{pa} e desvio padrão de I_{pc} de 2.18%, variações que estatisticamente não foram significativas por terem sido menores que 5.00% o que demonstra uma estabilidade na limpeza da superfície de trabalho do ECV.

Figura 14: Voltametria cíclica superfície limpa.



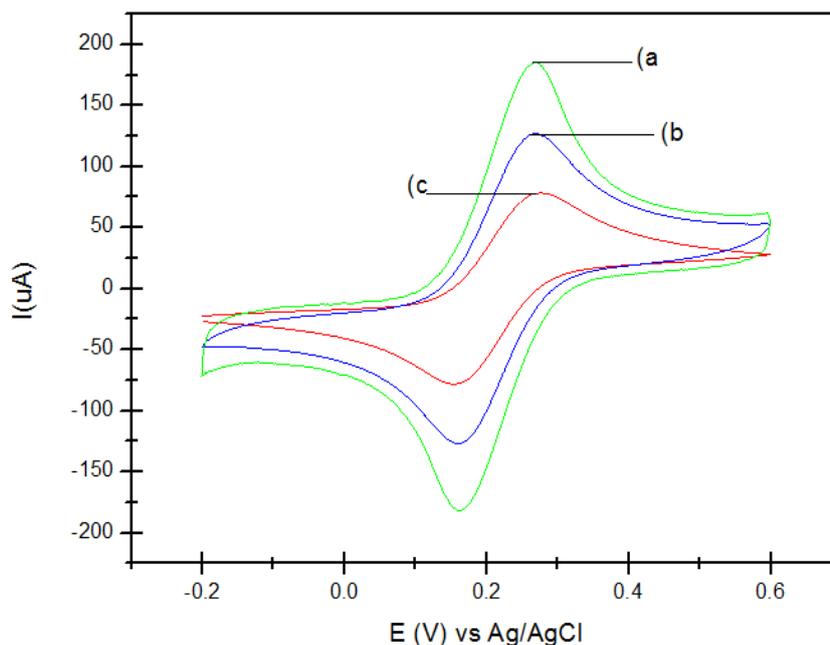
Fonte: SILVA JR, 2016.

5.3 Modificação da superfície de trabalho

Depositou-se GOr-PSU disperso em clorofórmio na concentração de 1 mg/mL pela técnica de deposição de camada por camada sobre a superfície do ECV e posto para secar à 40° C por 20 min e em seguida realizado VC, foi realizado o mesmo procedimento para análise de GOR e caracterizado por VC e comparados. Observou-se (Figura 15) que com os nanomateriais depositados houve um aumento da área eletrocatalítica. O GOr-PSU demonstrou um aumento de 146.79% de I_{pa} em relação ao I_{pa} do GOR. Este aumento se deve à condutividade do filme, pode ser atribuído a ressonância do anel aromático e suas duplas ligações entre os carbonos (MEDEIROS *et al.*, 2012) presente na polissulfona. As respostas descritas foram observadas em solução aquosa de $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$, garantindo que os picos de oxidação e redução observados em intervalo potencial de - 0.2 e 0.6 V respectivamente, devem-se ao GOr-

PSU uma vez que a solução é considerada inerte eletroquimicamente, por possuir apenas um elétron para troca.

Figura 15: Voltametria cíclica: a) GOr-PSU; b) GOR; c) ECV limpo.



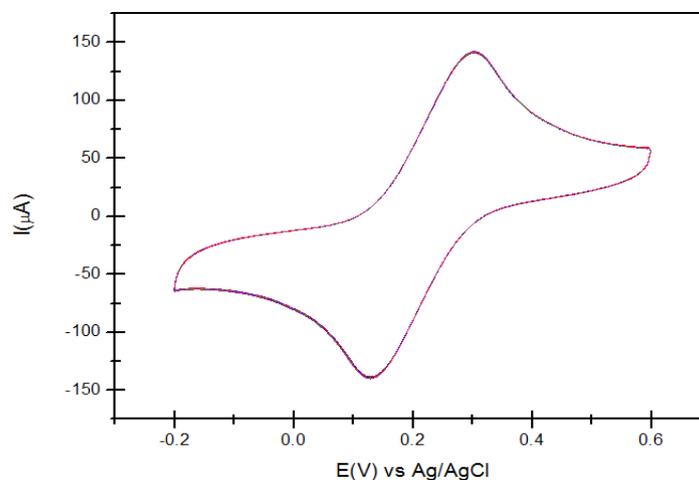
Fonte: SILVA JR, 2016.

5.4 Caracterização eletroquímica do filme de GOr-PSU

5.4.1 Estudos de estabilidade e mecânicos

A partir do gráfico de VC formado da análise do GOr-PSU (Figura 16), calculou-se o desvio padrão e o coeficiente de variação do I_{pa} e I_{pc} dos 20 ciclos aplicados a superfície modificada do ECV com GOr-PSU. O coeficiente de variação calculado para I_{pa} e I_{pc} do ECV/GOr-PSU foi respectivamente de 0.25% e 0.35%, demonstrando que o filme formado por GOr-PSU apresenta-se estável.

Figura 16: VCs demonstrando a estabilidade da membrana de GOr-PSU após 15 ciclos consecutivos a 50 mV s^{-1} .

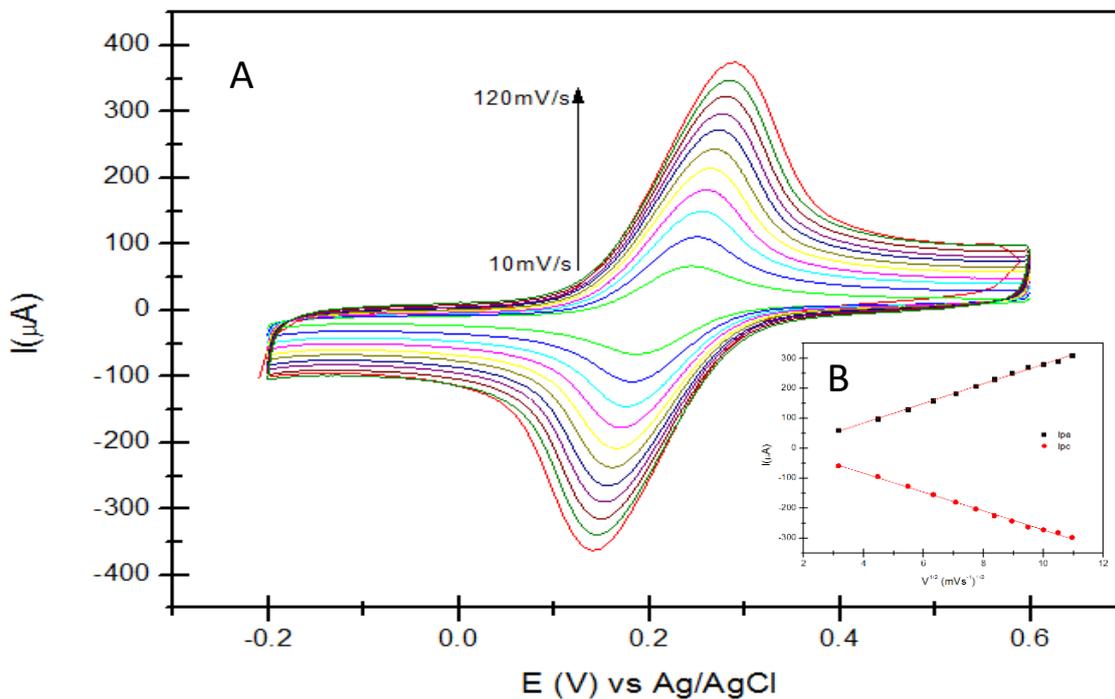


Fonte: SILVA JR, 2016.

5.4.2 Estudo da variação de velocidade de varredura

A transferência de elétrons na interface sensora modificada com o filme de GOr-PSU foi avaliada submetendo o ECV a leituras em diferentes velocidades de varredura (10 a 120 mV/s). De acordo com os VCs obtidos na **Figura 16**, os potenciais dos I_{pa} e I_{pc} não variaram em função da velocidade de varredura selecionada para o estudo e o coeficiente de correção linear de I_{pa} e I_{pc} foram 0,9986 e 0,9989 respectivamente, observou-se ainda média de I_{pa}/I_{pc} de $1.02 \mu\text{A}$ e coeficiente de variação de 2,81% o que estatisticamente demonstra que o filme apresentou reversibilidade eletroquímica. Os valores em corrente dos picos redox em relação à raiz quadrada das velocidades de varredura, apresentados no *inset* (Figura 17), variaram proporcionalmente, sugerindo um processo controlado por difusão (SILVA *et al.*, 2014).

Figura 17: (A) VCs do ECV/compósito sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 mV s^{-1}). Medidas realizadas em ferrocianeto e ferricianeto de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) preparado em KCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); (B) Dependência das correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.



Fonte: SILVA JR, 2016.

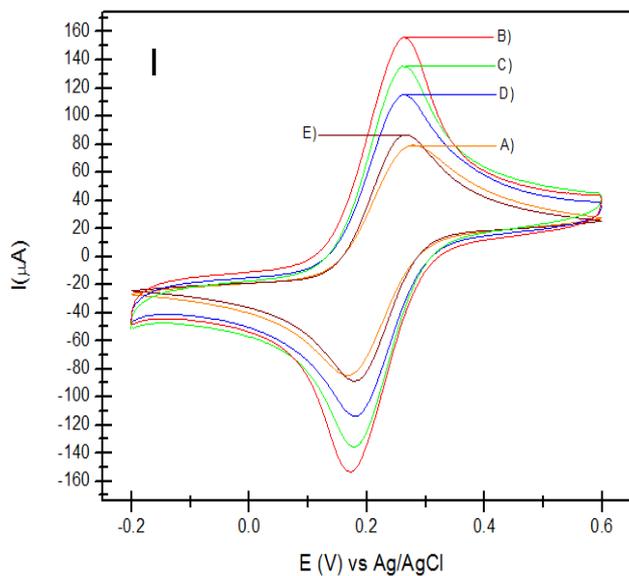
5.5 Caracterização eletroquímica do imunossensor

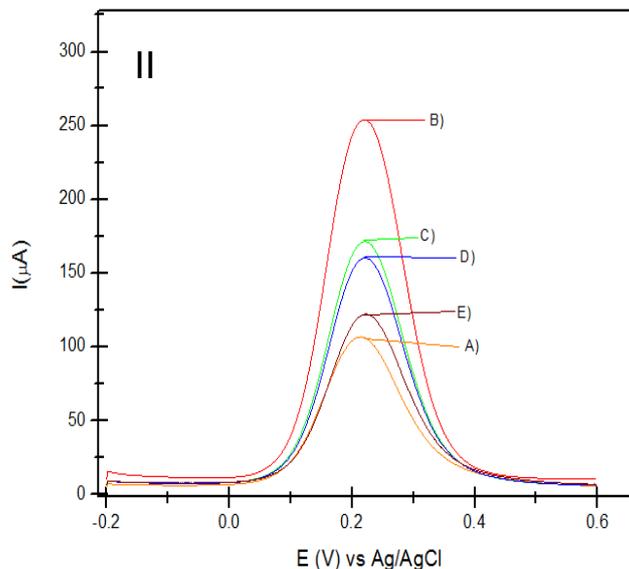
A caracterização da imobilização dos Anti-PCC na superfície do eletrodo foi avaliada utilizando-se as técnicas de VC e VOQ, Figura 18 (I) e (II), respectivamente. Comparando os voltamogramas do estudo, observou-se uma redução proporcional dos picos redox do ECV limpo (Fig 18 (a)) e aumento de I_{pa} e I_{pc} em ECV/GOr-PSU (Fig 18 (b)) em relação ao ECV limpo (Fig18 (a)). Esse perfil demonstra a contribuição do filme de GOr-PSU com aumento da área eletrocatalítica como descrito anteriormente, e a característica condutora do nanomaterial. Os antígenos citrulina foram imobilizados por adsorção na superfície do filme de GOr-PSU formada sobre o a superfície de trabalho do ECV.

Foi possível observar a redução dos I_{pa} e I_{pc} após formação das camadas: ECV/GOr-PSU /CCP-Ag (Fig 18 (c)), ECV/ GOr-PSU /CCP-Ag/GLICINA (Fig 18 (d)), com a imobilização do CCP-Ag e o bloqueio com glicina, houve a formação de uma camada isolante que dificulta o processo de difusão de elétrons devido à formação de uma camada isolante na interface sensor/eletrolito. Na imobilização de 0,3 ng/mL do Anti-

PCC (Fig 18 (e)), também houve uma diminuição da amplitude das correntes redox. Este fenômeno pode ser atribuído à obstrução da cinética de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo, decorrente da natureza isolante do anticorpo que impede a difusão de cargas para a superfície do eletrodo.

Figura 18:(I) VCs e (II) VOQ das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/GOr-PSU; (c) ECV/GOr-PSU/CCP-Ag; (d) ECV/GOr-PSU/CCP-Ag/GLICINA; (e) ECV/GOr-PSU/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.





Fonte: SILVA JR, 2016.

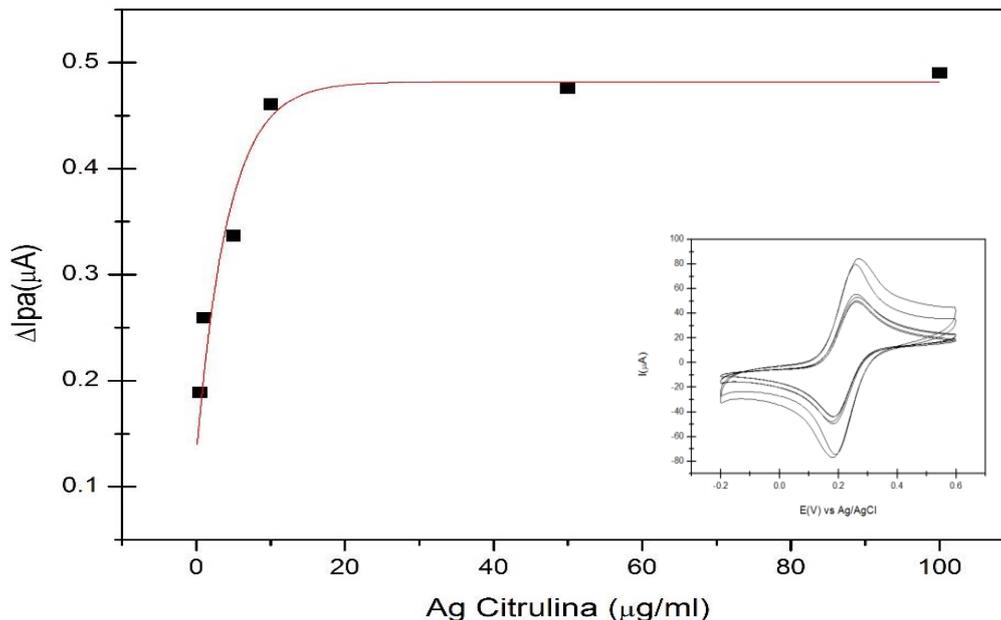
5.6 Otimização dos parâmetros do Imunossensor

5.6.1 Otimização da curva de imobilização de Anti-PCC

Estudos sobre a influência da concentração de antígeno citrulina (CCP-Ag) imobilizado são essenciais para o desempenho analítico do imunossensor, visto que esse fator afeta a reação de bioafinidade através da formação de imunocomplexos na interface sensora. Um estudo de concentração de CCP-Ag foi realizado para padronização do imunoenensaio eletroquímico. Diferentes concentrações de antígeno foram imobilizadas sobre a superfície ECV/GOr-PSU.

Sobre a superfície do ECV modificado com o filme de GOr-PSU foi imobilizado diferentes concentrações de CCP-Ag (0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 5.0; 10; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$). Os valores de corrente do estudo foram analisados através da variação de I_{pa} do ECV com o antígeno imobilizado em relação ao filme nanoestuturado (ΔI_{pa}). Como pode ser observado na (Figura 19), os valores de ΔI_{pa} exibiram uma resposta máxima na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno, sendo observada a saturação do sistema. Assim, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi adotada para realização dos testes seguintes.

Figura 19: Influência das diferentes concentrações de CCP-Ag imobilizado sobre o ECV/GOr-PSU/CCP-Ag. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.



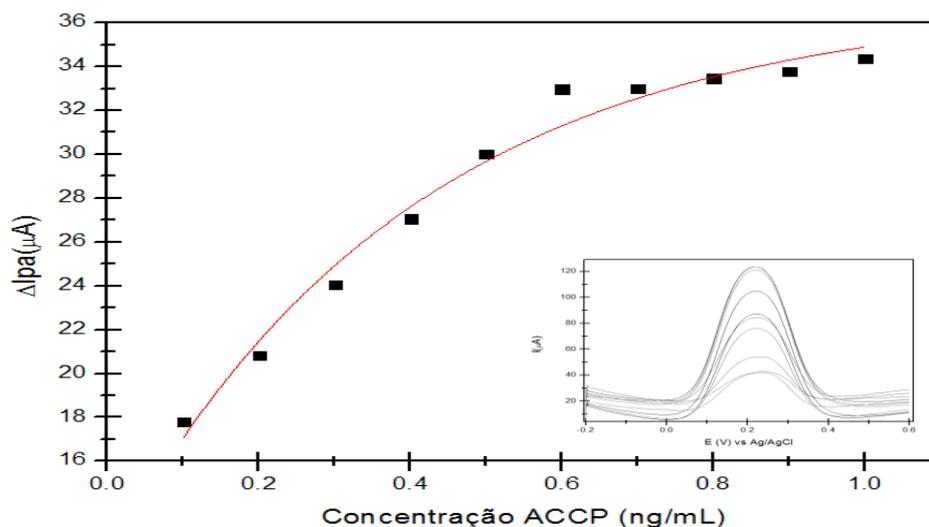
Fonte: SILVA JR, 2016.

5.6.2 Curva de concentração anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (Anti-PCC)

Para construção da curva analítica de calibração do imunossensor proposto, a técnica de voltametria de onda quadrada foi empregada. As medidas de corrente foram obtidas através da relação entre a obstrução cinética de transferência de elétrons na superfície do eletrodo e as diferentes concentrações de Anti-PCC (BARD & FAULKNER, 2006), após processo de biointeração com o antígeno de CCP-Ag (SILVA *et al.*, 2013). Na superfície do ECV, previamente modificada com o filme ECV/ GOr-PSU/CCP-Ag/GLICINA, foi incubado com anticorpos Anti-PCC sob diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 ng/mL), todas preparadas em tampão PBS (0,01 M, pH 7,4). Os valores de corrente do estudo foram analisados através da variação de I_{pa} do ECV com o anticorpo imobilizado em relação ao filme nanoestruturado (ΔI_{pa}). Como pode ser observado na Figura 20, os valores de ΔI_{pa} exibiram uma resposta máxima de saturação do sistema na concentração de 0,6

ng/mL de anticorpo, sendo observada uma saturação do sistema em concentrações superiores..

Figura 20: Influência das diferentes concentrações de Anti-PCC immobilizado sobre o ECV/GOr-PSU/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.

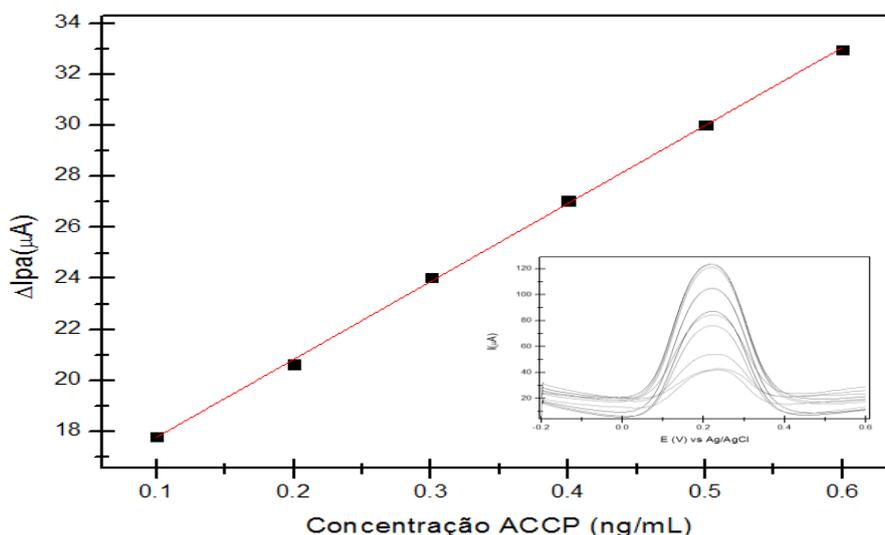


Fonte: SILVA JR, 2016.

Os imunossaios eletroquímicos foram realizados sob todas as condições experimentais otimizadas. Os valores de ΔI_{pa} da curva de calibração foram obtidos através da diferença entre os picos dos voltamogramas de onda quadrada da camada ECV/GOr-PSU/ CCP-Ag/ Glicina/ Anti-PCC subtraindo do mesmo o valor de I_{pa} da camada ECV/GOr-PSU/ CCP-Ag/ Glicina tida como branco dos testes. Observando-se aumento proporcional das variações de ΔI_{pa} em relação às concentrações de Anti-PCC de acordo com a figura 21. O comportamento do imunossensor foi linear nas diferentes concentrações de Anti-PCC, com coeficiente de correlação linear (r) de 0,978 ($p < 0,001$; $n = 6$). O limite de detecção (LD) do imunossensor foi calculado de acordo com a seguinte equação: $LD = 3DV/m$, onde DV é desvio padrão da medida do branco e m é o coeficiente angular da região linear da curva de calibração. O LD do imunossensor proposto foi 0,004 ng/mL e limite de quantificação (LQ) de 0,014 ng/mL.

Observou-se que comparando-se o coeficiente angular da região linear da curva de calibração de conjugação do Anti-PCC e do IgG, onde o coeficiente angular da região linear do Anti-PCC teve um valor de 0,66 e 0,33 para IgG, demonstraram que a afinidade da plataforma criada foi 2 vezes maior para Anti-PCC que para IgG, o IgG por ser inespecífico tem a capacidade de se conjugar com qualquer antígeno, porém a plataforma construída para detectar Anti-PCC demonstrou maior afinidade para este anticorpo, sendo sensível para tal.

Figura 21: Curva analítica do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de Anti-PCC. Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.



Fonte: SILVA JR, 2016.

O teste laboratorial para detecção do Anti-PCC pela técnica de ELISA possui capacidade de quantificar apenas valores superiores há 17 U/mL (CONRAD, *et al.*, 2010). Porém, resultados de testes positivos para Anti-PCC são considerados como risco de desenvolvimento futuro da AR, assim, o imunossensor baseado no filme de GOr-PSU mostrou-se sensível para detecção da Anti-PCC em níveis de importância clínica para diagnóstico do AR.

6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi utilizado o filme de GOr-PSU para construção de um imunossensor eletroquímico para detecção de Anti-PCC.

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com o filme nanoestruturado de GOr-PSU contribuiu para construção de um sensor estável e reprodutível eletroquimicamente.

O filme nanoestruturado de GOr-PSU mostrou-se bastante estável e reprodutível eletroquimicamente, podendo ser empregado para imobilização orientada dos anticorpos Anti-PCC. Espera-se que através da detecção de Anti-PCC utilizando diferentes técnicas eletroanalíticas possam ser desenvolvidos ensaios mais rápidos e simples. Assim, aliado a plataforma sensora que está sendo desenvolvida, o sistema representa uma alternativa viável, promissora, de custo reduzido e fácil aplicação para determinação do Anti-PCC.

A otimização das condições experimentais forneceu uma curva analítica para as diferentes concentrações de Anti-PCC do imunossensor proposto, demonstrando que o sistema apresentou boa linearidade com $r=0,996$ ($p < 0,003$; $n = 6$), e um limite de detecção de $0,004$ ng/mL para o Anti-PCC.

Como perspectivas futuras deste trabalho, tem-se a realização de alguns estudos complementares, incluindo microscopia de força atômica para caracterização topográfica do filme e das imobilizações e testes com amostras de soro ou sangue total humano de pacientes saudáveis e com AR. Estes ensaios irão permitir a determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica do imunossensor proposto, sua confiabilidade e praticidade quando comparado a outros sistemas comerciais usados na determinação dos níveis séricos de Anti-PCC.

7. REFERÊNCIAS

ALARCON, R. T; ANDRADE, L, C. Auto-antibodies to citrullinated proteins and rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 180-87, 2007.

ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering**: v. 33, n. 4, p. 1853-59, 2013.

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

BIZZARO, N.; MAZZANTI, G.; TONUTTI, E.; VILLALTA, D.; TOZZOLI, R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clinical chemistry*, v. 47, n. 6, p. 1089–93. 2001.

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

BURMESTER, G. R.; FEIST, E.; DÖRNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, v. 10, n. 2, p. 77-88. 2014.

CARMONA, L.; CROSS, M.; WILLIAMS, B.; LASSERE, M.; MARCH, L. Rheumatoid arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, v. 24, n. 6, p. 733–45, 2010.

CHAI, R.; YUAN, R.; CHAI, Y.; OU, C.; CAO, S.; LI, X. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin. **Talanta**, v.74, p. 1330-36, 2008.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. *Biosensors & bioelectronics*, v. 17, n. 6-7, p. 441–56, 2002.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 51, n. 5, p. 3–11, 2012.

CHUNG, C., KIM, Y. K., SHIN, D., RYOO, S. R., HONG, B. H., & MIN, D. H. Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 10, p. 2211-24, 2013.

COENEN, D.; VERSCHUEREN, P.; WESTHOVENS, R.; BOSSUYT, X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clinical chemistry*, v. 53, n. 3, p. 498–504, 2007.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; REINHOLD, D.; DÖRNER, T. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. *Autoimmun Rev*, v. 9, n. 6, p. 431-5, 2010.

CORK, J M. REBECCA JONES, J SAWY E. Low cost, disposable biosensors allow detection of antibodies with results equivalent to ELISA in 15 min. **Journal of Immunological Methods**. v. 387, n. 1, p. 2 – 31, 2013.

DAVID, J.M.; MATTEI, R.A.; MAUAD, J.L.; ALMEIDA, L.G.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI SILVA, P.V.; MENOLLI, R. A. Estudo clínico e laboratorial de pacientes com artrite reumatóide diagnosticados em serviços de reumatologia em Cascavel, PR, Brasil. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 53, n.1, p. 57-65, 2013.

DURAND P, SKOTTRUP, MOGENS N. A, JUSTESEN F. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosens & Bioelectron*. v. 24, n. 3, p.339-48, 2008.

FATHI, D.A Review of electronic band structure of graphene and carbon nanotubes using Tight Binding. *Journal of Nanotechnology*. vol. 11, n. 1, p. 1-6, 2011.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 356–61, 2003.

FORSLIND, K.; AHLMÉN, M.; EBERHARDT, K.; HAFSTRÖM, I.; SVENSSON, B. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical

practice: role of antibodies to citrullinated peptides (Anti-PCC). *Annals of the rheumatic diseases*, v. 63, n. 9, p. 1090–5, 2004.

GAALLEN, F. A VAN; LINN-RASKER, S. P.; VENROOIJ, W. J. VAN; *et al.*. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis and rheumatism*, v. 50, n. 3, p. 709–15, 2004.

GAALLEN, F. A VAN; VISSER, H.; HUIZINGA, T. W. J. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 64, n. 10, p. 1510–2, 2005.

GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S. The rise of graphene. *Nature Materials*, vol. 6, pp. 183–191, 2007.

GOLDRING, S. R.; PURDUE, P. E.; CROTTI, T. N. Bone remodelling in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*, v. 72, p. 52- 55, 2013.

GOODSON, N. J.; FARRAGHER, T. M.; SYMMONS, D. P. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, v. 35, n. 6, p. 945-9, 2008.

Gunlycke, D., Li, J., Mintmire, J. W. & White, C. T. Edges bring new dimension to grapheme nanoribbons. *Nano Lett.* v.10, n.1, p. 3638–42, 2010.

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

INGEGNOLI, F.; CASTELLI, R.; GUALTIEROTTI, R. Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis Markers*, v. 35, n. 6, p. 727-34, 2013.

LAWAL, A. T. Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors. *Talanta*, v. 131, p. 424-43, 2015.

LINDEN, M. P. M. VAN DER; WOUDE, D. VAN DER; IOAN-FACSINAY, A.; *et al.*. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic

citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rh. *Arthritis and rheumatism*, v. 60, n. 8, p. 2232–41, 2009.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 1318-25, 2006.

MAJKA, D. S. *et al.* Duration of preclinical RA-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. *Ann Rheum Dis*, v. 67, p. 801-7, 2008.

MARQUES, J.F.; GONÇALVES, E.T.; LANGEN, L.F.O.B.; CUNHA, M.F.L.; RADOMINSKI, S.; OLIVEIRA, S.M.; CURY, S.E.; MEDEIROS, F.; SAMPAIO, G.C. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatoide do adulto em amostras da população brasileira. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 33, n. 5, p. 169 – 73, 1993.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, v. 365, n. 23, p. 2205–19, 2011.

MEDYANTSEVA E. P., KHALDEEVAE. V, BUDNIKOVG. K..Immunosensors in Biology and Medicine: Analytical Capabilities, Problems, and Prospects. *Journal of Analytical Chemistry* October, v. 56, n. 10, p. 886-900, 2001.

Medeiros, E., Oliveira, J. E., Consolin-Filho, N., Paterno, L. G., & Mattoso, L. H. C. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 2: Aplicações em sensores. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.7, n. 3, p. 144-158, 2012.

MONOSIK, R.; STREDANSKY, M.; TKAC, J.; STURDIK, E. Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages *Food Anal. Methods*, v. 5, p. 40–53, 2012.

NIELEN, M.M.; VAN SCHAARDENBURG, D.; REESINK, H.W.; VAN DE STADT, R.J.; VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I.E.; DE KONING, M.H.; HABIBUW, M.R.; VANDENBROUCKE, J.P.; DIJKMANS, B.A. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* v. 50, n. 2, p. 380-6, 2004.

NOVOSELOV, K. S., GEIM, A. K., MOROZOV, S. V., JIANG, D., ZHANG, Y., DUBONOS, S. A., & FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, v. 306, n. 5696, p. 666-69, 2004.

PARK, H.B.; SHIN, H.S.; LEE, Y.M.; RHIM, J.H. Annealing effect of sulfonated polysulfoneionomer membranes on proton conductivity and methanol transport. *J. Membrane Sci.*, v. 24, n.7, p. 103-19, 2005.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, p. 1349-56, 2003.

PERRICONE, C.; CECCARELLI, F.; VALESINI, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmunity reviews*, v. 10, n. 10, p. 599–608, 2011.

PUMERA, M., AMBROSI, A., BONANNI, A., CHNG, E. L. K., & POH, H. L. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 9, p. 954-965, 2010.

RICCARDI, C. DOS S.; COSTA, P. I. DA; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. *Quim. Nova*, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

ROSA NETO, N.S.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 49, n. 4, p. 413-30, 2009.

SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 2749-65, 2009.

SHELLEKENS, G. A; JONG, B. A DE; HOOGEN, F. H. VAN DEN; PUTTE, L. B. VAN DE; VENROOIJ, W. J. VAN. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of clinical investigation*, v. 101, n. 1, p. 273–81, 1998.

SHELLEKENS, G. A; VISSER, H.; JONG, B. A DE; *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and rheumatism*, v. 43, n. 1, p. 155–63, 2000.

SCHOLZ, F.; *Electroanalytical Methods, Electroanalytical Methods Guide To Experiments And Applications*, SPRINGER-VERLAG: BERLIN, 2010.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SENNA, É. R.; BARROS, A. N. A. L. P. D. E.; SILVA, E. O. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. *The Journal of rheumatology*, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SHEN, G.; TAN, S.; NIE, H.; SHEN, G.; YU, R. Electrochemical and piezoelectric quartz crystal detection of antisperm antibody based on protected Au nanoparticles with a mixed monolayer for eliminating nonspecific binding. *Journal of immunological methods*, v. 313, n. 1, p. 11–9, 2006.

Y., YUAN, R., CHAI, Y., & HE, X. Development of an amperometric immunosensor based on TiO₂ nanoparticles and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, v. 52, p. 3518–3524, 2007.

SHMERLING, R. H.; DELBANCO, T. L. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *The American journal of medicine*, v. 91, n. 5, p. 528–34, 1991.

LMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, v. 4, n. 3, p. S265–72, 2002.

SINGH, V.; JOUNG, D.; ZHAI, L.; DAS, S.; KHONDAKER, S.; SEAL, S. Graphene based materials: Past, present and future. *Progress in Materials Science*, vol. 56, p. 1178–1271, 2011.

SILVA, B. V., CAVALCANTI, I. T., MATTOS, A. B., MOURA, P., MARIA DEL PILAR, T. S., & DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 3, p. 1062-67, 2010.

SIVALINGAM, S. P.; THUMBOO, J.; VASOO, S.; *et al.* In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, v. 36, n. 2, p. 96–9, 2007.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; BIJLSMA, J. W. J.; *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 4, p. 631–7, 2010.

Song, Y. W., & Kang, E. H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *Q J Med*, v. 103, p. 139–146, 2010.

SOUZAE. G, KUBOTA, L. T, YAMAMOTO Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, v. 22, n. 6, 874-881, 1999.

TAK, P. P.; BRESNIHAN, B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 43, n. 12, p. 2619–33, 2000.

TANG, J., TANG, D., NIESSNER, R., CHEN, G., & KNOPP, D. Magneto-Controlled Graphene-Immunosensing Platform for Simultaneous Multiplexed Electrochemical Immunoassay Using Distinguishable Signal Tags. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 13, p. 5407-14, 2011.

TANG, J.-L.; CHENG, S.-F.; HSU, W.-T.; CHIANG, T.-Y.; CHAU, L.-K. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 119, n. 1, p. 105–109, 2006.

TAYLOR, P.; GARTEMANN, J.; HSIEH, J.; CREEDEN, J. A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated Peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. *Autoimmune diseases*, v. 20, n 1, p. 815 - 38, 2011.

TEIXEIRA, S., BURWELL, G., CASTAING, A., GONZALEZ, D., CONLAN, R. S., & GUY, O. J. Epitaxial grapheneimmunosensor for human chorionic gonadotropin. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 190, p. 723-729, 2014.

THUSU, R. Strong growth predicted for biosensors Market, 2010.

VASSOS, B. H.; EWING, G. W.; *Electroanalytical Chemistry*. JOHN WILEY & SONS: LAS VEGAS, 1983.

VENCOVSKÝ, J.; MACHÁČEK, S.; SEDOVÁ, L.; *et al.* Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 62, n. 5, p. 427–30, 2003.

VENROOIJ, W. J. VAN; HAZES, J. M.; VISSER, H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *The Netherlands journal of medicine*, v. 60, n. 10, p. 383–8, 2002a.

VENROOIJ, W. J. VAN; HAZES, J. M.; VISSER, H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *The Netherlands journal of medicine*, v. 60, n. 10, p. 383–8, 2002b.

VOSSENAAR, E. R.; VENROOIJ, W. J. VAN. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, v. 6, n. 3, p. 107–11, 2004.

YAO, J., SUN, Y., YANG, M., & DUAN, Y. Chemistry, physics and biology of graphene-based nanomaterials: new horizons for sensing, imaging and medicine. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, n. 29, p. 14313-329, 2012.

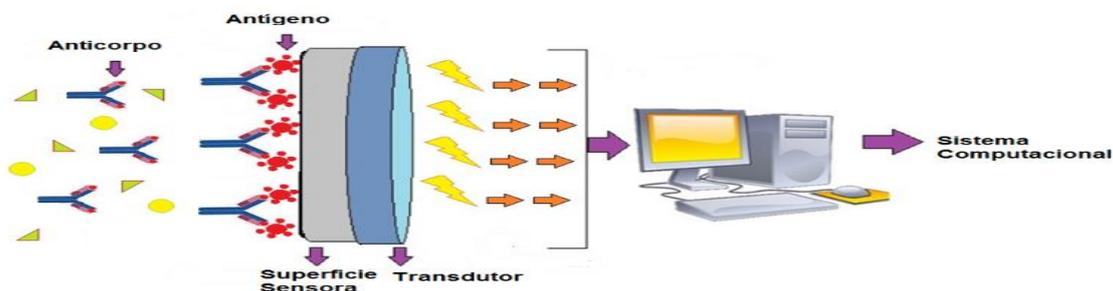
ZUO, X.; HE, S.; PENG, L.D.C.; HUANG, Q.; SONG, S.; FAN, C. Graphene oxide-facilitated electron transfer of metalloproteins at electrode surfaces. *Langmuir*, vol. 26, p. 1936–1939, 2010.

APÊNDICE



{Será submetido a Revista Química Nova}

Graphical Abstract



Biosensors are analytical devices incorporating a biological element and a physicochemical transducer element. These produce an electrical signal proportional to the presence and / or concentration of one or multiple analytes existing in a sample (HOLFORD, DAVIS& HIGSON, 2012).

NANOIMUNOSENSOR BASEADO EM GRAFENO-POLISSULFONA PARA DETECÇÃO DE ARTRITE REUMATÓIDE: ANTIPEPTÍDEO CITRULINA CÍCLICO.

SILVA JR, A.A.*; RODRIGUEZ, B.A.G.*; BAHAMONDE, J.P.**;
VELAZQUEZ, V.G.**; DUTRA, R.A.F.***

*Laboratório de Eng. Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

** Departamento de Materiais, Universidade de Houston, Madri, Espanha.

***Departamento de Eletrônica e Sistemas, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brasil

e-mail: rosa.dutra@ufpe.br

IMMUNOSENSOR BASED ON GRAPHENE-POLYSULFONE FOR DETECTING RHEUMATOID ARTHRITIS: CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODY.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic degenerative disease, systemic, autoimmune. Currently, the cyclic citrullinated peptide antibody (Anti-PCC) is considered the most important marker for the predictive diagnosis and prognosis of RA. In this work, we developed an electrochemical immunosensor for the detection of Anti-PCC, from the modification of the surface of a glassy carbon electrode with nanocomposite polysulfone graphene-oxide (GO-PSF). To capture Anti-PCC, citrullinated peptides (CCP-Ag) were immobilized on the electrode surface of the nanocomposite by likely covalent bond between the amino and carboxylic groups present in the CCP-Ag and graphene oxide, respectively. The voltammetry technique square wave (VOQ) was used for detection of Anti-PCC producing a marking-free immunosensor. It was observed that the GO-PSF was capable of increasing the anodic peak current (IPA) 2.2 times as compared with control (no GO-PSF) demonstrating that the electrocatalytic film provided better capacity also being stable (coefficient the variation of the current <1%) evaluated by subjecting the electrode 20 consecutive cycles of cyclic voltammetry. The proposed immunosensor exhibited good linearity with $r = 0.983$ ($p < 0.003$; $n = 5$) and a detection limit of 0.004 ng / ml Anti-PCC. The sensing platform demonstrated desirable properties of stability, sensitivity and reproducibility in the Anti-PCC detection with prospects of development of devices "point-of-care."

Keywords: Rheumatoid Arthritis, immunosensor, Anti-citrulline (Anti-PCC).

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica inflamatória, autoimune, três vezes mais frequente em mulheres do que em homens. No Brasil, tem prevalência de aproximadamente 0,46%, e esta aumenta com a idade e é maior em mulheres acima de 65 anos, sugerindo a participação de fatores hormonais na patogenia. A AR é uma doença multifatorial onde fatores genéticos e ambientais estão envolvidos tais como: os genes (HLA-DRB1 e PTPN22), tabagismo, poluentes, fatores dietéticos e infecções

virais. Atualmente, o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-PCC) é considerado o marcador mais importante para o diagnóstico preditivo e prognóstico da AR. Esse anticorpo pode ser detectado em cerca de 80% dos soros de pacientes com AR e com especificidade de 95% a 99% [1,2].

Os testes para detecção de anticorpos Anti-PCC têm mostrado excelente desempenho diagnóstico, especialmente o ensaio imunoenzimático. Entretanto, esta técnica é onerosa, e demanda serviços especializados na determinação de Anti-PCC, nos serviços públicos de saúde do Brasil, tornando inviável para o sistema único de saúde e inacessível aos pacientes [3].

Diante da necessidade da realização de métodos de diagnósticos mais rápidos, práticos e de baixo custo, surgem os imunossensores, que são baseados em reações imunológicas específicas, tendo antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Diferentes tipos de transdutores são utilizados para imunossensores, tais como eletroquímico, óptico e piezoelétrico. Nanomateriais têm sido relatados como uma melhora na sensibilidade destes transdutores [4]. O grafeno têm atraído grande interesse devido ao aumento da transferência de elétrons, ancoragem de biomoléculas após a sua funcionalização, e também para ampliar a superfície ativa. Esta metodologia tem sido de bastante interesse para pesquisas biomédicas, e podem ser utilizados em serviços descentralizados, tornando-se ideais para testes tipo “*point-of-care*” devido à sua portabilidade, e ainda comparado aos teste de ELISA, estes sensores se destacam por apresentarem resultados quantitativos e utilizarem quantidades de poucos microlitros de amostra [5,6].

Nos últimos anos, vários tipos de imunossensores e suas aplicações em diagnósticos e tratamentos médicos têm sido estudados. Estes dispositivos surgem como ferramentas promissoras, em especial os imunossensores eletroquímicos que combinam a alta especificidade de métodos imunoquímicos tradicionais empregando sistemas eletroquímicos sensíveis logo o presente estudo teve como alvo desenvolver um imunossensor baseado em grafeno-polissulfona para detecção da artrite reumatoide através do Anti-PCC.

EXPERIMENTAL

Materiais

Antígenos de citrulina e anticorpos anti-peptídeo citrulinado foram adquiridos da Calbiochem (EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), glicina adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). Grafeno-polissulfona (GO-PSF) foi sintetizado pelo método de Hummers. Clorofórmio foi obtido da VETEC (BRA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Aparelhos e Medições

Os estudos eletroquímicos foram executados em uma célula de vidro fechada, contendo um sistema composto por um eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, um fio de platina helicoidal como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl (sat. KCl) como referência, todos conectados a um potenciostato/galvanostato modelo PalmSens (PalmSens BV, HOL) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software PStTrace soft. As análises eletroquímicas utilizando as técnicas de VC, executada em -0,2 a 0,6 V, 50 mV s⁻¹, e VOQ, executada em -0,2 a 0,6 V, 50 mV s⁻¹, foram realizadas em solução de KCl (100 mmol L⁻¹) contendo $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L⁻¹) como sonda redox. A caracterização morfológica do filme foi executada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) usando um microscópio Philips XL-30 FEG, com aceleração na voltagem de 10 kV.

Pré-tratamento e modificação do eletrodo de trabalho

Após o polimento mecânico do eletrodo de trabalho em alumina 0.3 μm para remoção de impurezas presentes na superfície (pré-tratamento), seguida de lavagem com água destilada, foi confirmada a limpeza por VC. Em seguida, foi realizada modificação da superfície do ECV, depositando 15 μL de GO-PSF disperso em clorofórmio por gotejamento, e deixado em temperatura ambiente para evaporação do solvente.

Construção da plataforma sensora nanoestruturada

Previamente as modificações da superfície sensora, o ECV foi mecanicamente polido com Al₂O₃ (0,5 µm) durante 3 min e lavado com água com o objetivo de remover impurezas da superfície, seguida de lavagem com água destilada, foi confirmada a limpeza por VC. Em seguida, foi realizada modificação da superfície do ECV, depositando 15 µL de GO-PSF disperso na concentração de 1 mg mL⁻¹ submetido por 2h em banho ultrassônico em clorofórmio por gotejamento, e deixado em temperatura ambiente para evaporação do solvente. Posteriormente, o ECV com o filme nanoestruturado foi incubado com 10 µL de antígeno citrulina (CCP-Ag) (10 µg mL⁻¹) durante 60 min a 25 °C para imobilização do mesmo. Os sítios livres reativos e inespecíficos da superfície eletródica foram bloqueados com uma solução de glicina (50 mmol L⁻¹) durante 60 min. Todas as etapas de modificação do ECV foram registradas através da técnica de VOQ.

Deteção eletroquímica da interação CCP-Ag/Anti-PCC

Após imobilização do CCP-Ag e bloqueio dos sítios inespecíficos com glicina, o ECV foi incubado durante 30 min com uma solução de Tampão PBS (0,01M, pH 7,4) contendo Anti-PCC em diferentes concentrações. A deteção da interação CCP-Ag/Anti-PCC foi monitorada por VOQ na presença da sonda redox K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.

RESULTADOS

As imagens de MEV foram utilizadas para caracterização da superfície do ECV antes e após modificação com GO-PSF (Fig.1). A superfície do ECV limpo (Fig. 1S (A)) é caracterizado por uma superfície lisa, pode-se observar na MEV do GO-PSF em pó (Fig. 1S (B)) , distribuição uniforme de uma estrutura porosa (ou esponjosa), característica comum ao polímero polisulfona. Na (Fig. 1S (C)) é demonstrado o recobrimento da superfície de ECV modificado com GO-PSF, apresenta uma distribuição regular do polímero, possivelmente este fato ocorre porque as folhas de grafeno provem alta área superficial o que favorece ao processo da polimerização com polisulfona de forma direta; o que melhora as propriedades de condutividade e atividade eletrocatalítica. Estas características demonstradas na MEV favorecem a imobilização de

biomoléculas, tornando o nanocompósito por GO-PSF um nanocompósito ideal para produção de plataformas sensoras, tendo em vista os aspectos de uma superfície como atividade electrocatalítica.

[Figura 1S]

Caracterização eletroquímica da plataforma nanoestruturada

Cada etapa de modificação da superfície de carbono vítreo foi monitorada por VC, obtendo-se os voltamogramas mostrados na Figura 2S. A adição dos GO-PSF promoveu um aumento de corrente no par de picos redox, aumentando 132 % a área sensora. A imobilização de CCP-Ag é representada por uma redução na amplitude dos picos redox, devido à natureza isolante da biomolécula. O bloqueio com glicina foi registrado por uma pequena redução nos picos redox.

[Figura 2S]

Modificação com GO-PSF

Depois da limpeza do ECV foi formado um filme de GO-PSF sobre a superfície de trabalho, o qual proporcionou o aumento da amplitude dos picos de oxidação e redução conforme perfil voltamétrico, foi comparado a modificação do ECV com GO-PSF com a modificação com GOR sem PSF, onde observou-se um aumento pela modificação com GO-PSF de 2,2 vezes dos picos de oxidação (Fig. 3S).

[Figura 3S]

Estudos mecanísticos

Este estudo consiste de diversos VCs em diferentes velocidades de varredura (10 a 120 mV/s) (Fig. 4S (a)). Nestes VCs foi observada a variação dos picos de oxidação e redução de acordo com a velocidade de varredura. Ambos os picos de corrente

aumentaram linear e proporcionalmente com o aumento da velocidade de varredura, demonstrando que o processo é reversível e controlado por difusão (Fig. 4S (b)).

[Figura 4S]

Estudo de Estabilidade da Matriz Sensora

Foi realizado mantendo-se a velocidade em 50 mV s^{-1} durante 20 ciclos de VC (Fig. 5S). O coeficiente de variação calculado para I_{pa} e I_{pc} do ECV/GO-PSF foi respectivamente de 0.25% e 0.35%, demonstrando que o filme formado por GO-PSF, demonstrando que não houve variações significativas, assim, a estabilidade da matriz ECV/GO-PSF.

[Figura 5S]

Imobilização de CCP-Ag sobre o filme de GO-PSF

Um estudo de concentração de CCP-Ag foi realizado para padronização do imunoenensaio eletroquímico. Diferentes concentrações de antígeno foram imobilizadas sobre a superfície ECV/GO-PSF. Os valores do ΔI_{pc} elevaram-se com o aumento da concentração até $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual a resposta permaneceu quase constante (Figura 6S), sendo esta concentração selecionada para os experimentos subsequentes.

[Figura 6S]

Curva de calibração

A Figura 7S demonstra a curva de calibração analítica obtida por VOQ para detecção da interação do CCP-Ag e Anti-PCC, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram uma redução da corrente proporcional em relação às concentrações de

Anti-PCC ($0,1 - 0,6 \text{ ng mL}^{-1}$, exibindo uma faixa linear com R de 0,978, $p < 0,001$ e limite de detecção de $0,004 \text{ ng mL}^{-1}$ e limite de quantificação de $0,014 \text{ ng mL}^{-1}$.

[Figura 7S]

DISCUSSÃO

A utilização de eletrodos modificados com nanocompósitos como o GO-PSF tem sido de grande interesse na eletroanálise. Neste trabalho, a superfície de carbono vítreo foi revestida com GO-PSF, um polímero rico em anéis aromáticos e modificado com óxido de grafeno reduzido, o que permitiu uma interação eficaz com as biomoléculas que interagiram sobre o filme formado, especialmente pela presença de grupos carboxílicos nestes nanomateriais, garantindo um aumento da estabilidade do filme na superfície. O GOR possibilita uma maior transferência de elétrons e condutividade, aumentando a sensibilidade na interface sensora [7]. A reação de bioafinidade GO-PSF/CCP-Ag/ foi quantificada eletroquimicamente através da correlação das variações de transferência de carga da camada do filme formado na interface do eletrodo e as concentrações do Anti-PCC avaliado. A aplicação do ECV modificado com o filme de GO-PSF para detecção da interação entre CCP-Ag e Anti-PCC possibilitou a obtenção de um baixo limite de detecção, semelhante ao encontrado por De Gracia Villa *et al.*[8]. Estes resultados demonstram o potencial uso Go-PSF como ferramenta para estudo e detecção do Anti-PCC expressado no evento fisiopatológico da AR, permitindo assim seu diagnóstico e prognóstico.

CONCLUSÃO

O imunossensor em desenvolvimento apresenta elevado potencial para diagnóstico da Artrite Reumatóide, podendo contribuir para um diagnóstico rápido e preciso. A matriz de imobilização se mostrou estável e pode ainda ser usada para portabilização do sensor para uso point-of-care.

REFERÊNCIAS

- [1] J. MICHELLE KAHLENBERG AND DAVID A. FOX. Advances in the Medical Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Hand Clinics*. 27 Pages 11–20, 2011.
- [2] FIONULA M. BRENNAN AND IAIN B. MCINNES. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis *J Clin Invest*. 118:3537–3545, 2008.
- [3] N. BOJORGERAMÍREZ, A. M. SALGADO AND B. VALDMAN. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. *Braz. J. Chem. Eng.* 26, pp. 227-249, 2009.
- [4] TRILLING A.K, BEEKWILDER J., ZUILHOF H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst*. 138: 1619-27, 2013.
- [5] KWON SY, LEE CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection *The Korean Journal of Hepatology* 2011; 17:87-95
- [6] HERBST MH, MACÊDOMIF, ROCCO AM. Tecnologia Dos Nanotubos De Carbono: Tendências E Perspectivas De Uma Área Multidisciplinar. *Quim.Nova*, Vol. 27, No. 6, 986-992, 2004.
- [7] MOKKAPATI, V. R. S. S., IMER, D. Y. K., YILMAZ, N., OZGUZ, V., & KOYUNCU, I. Protein mediated textile dye filtration using graphene oxide–polysulfone composite membranes. **RSC Advances**, v. 5, n. 87, p. 71011-71021, 2015.
- [8] DE GRACIA VILLA, M., JIMÉNEZ-JORQUERA, C., HARO, I., GOMARA, M. J., SANMARTÍ, R., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C., & MENDOZA, E.. Carbon nanotube composite peptide-based biosensors as putative diagnostic tools for rheumatoid arthritis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 113-118, 2011.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1S - Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície de eletrodo de carbono vítreo modificado. A) ECV não modificado; B) GO-PSF em pó; C) GO-PSF sobre ECV

Figura 2S:(I) VCs das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/GO-PSF; (c) ECV/GO-PSF/CCP-Ag; (d) ECV/GO-PSF/CCP-Ag/GLICINA; (e) ECV/GO-PSF/CCP-Ag/GLICINA/Anti-PCC. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl

Figura 3S: Voltametria cíclica: a) GO-PSF; b) GOR; c) ECV limpo

Figura 4S: (A) VCs do ECV/composto sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 $mV s^{-1}$). Medidas realizadas em ferrocianeto e ferricianeto de potássio (0,5 mol L⁻¹) preparado em KCl (0,5 mol L⁻¹); (B) Dependência das correntes de pico anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura

Figura 5S: VCs demonstrando estabilidade da membrana de GO-PSF após 15 ciclos consecutivos a 50 $mV s^{-1}$

Figura 6S: Influência das diferentes concentrações de CCP-Ag imobilizado sobre o ECV/GO-PSF/CCP-Ag. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl

Figura 7S: Curva analítica do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de Anti-PCC. Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.

FIGURAS

Figura 1S

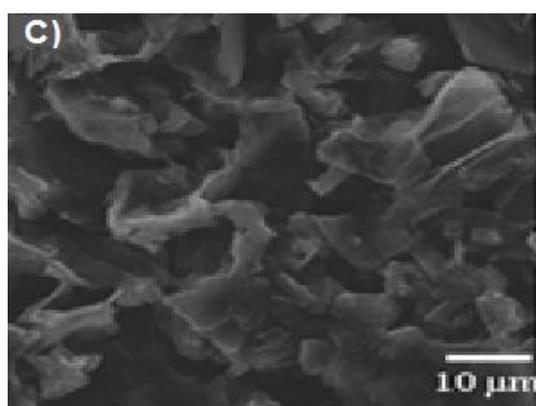
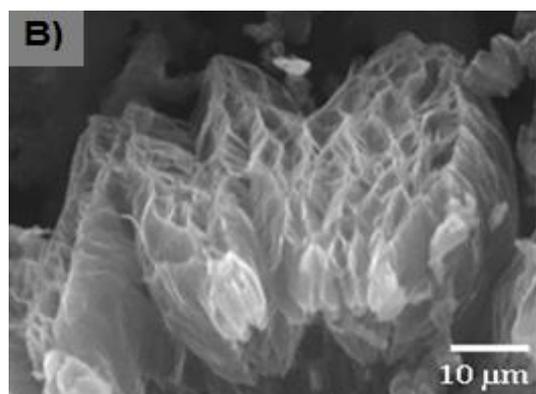
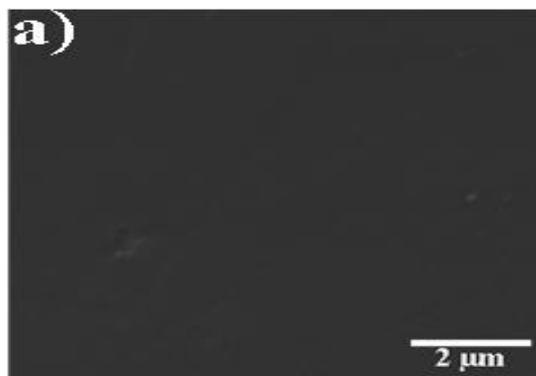


Figura 2S

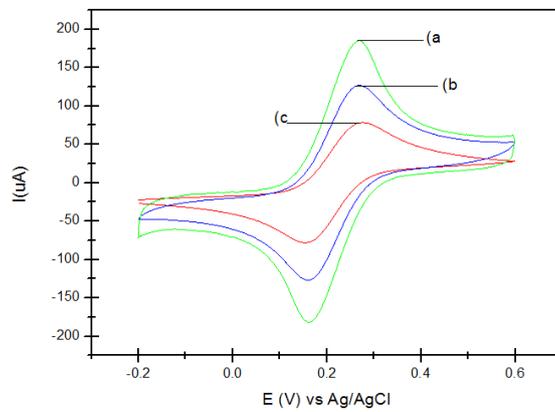
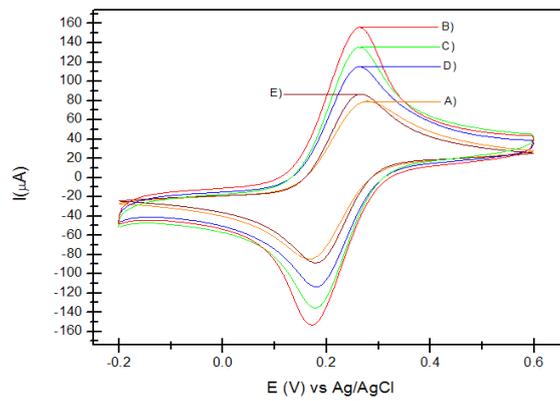
**Figura 3S**

Figura 4S

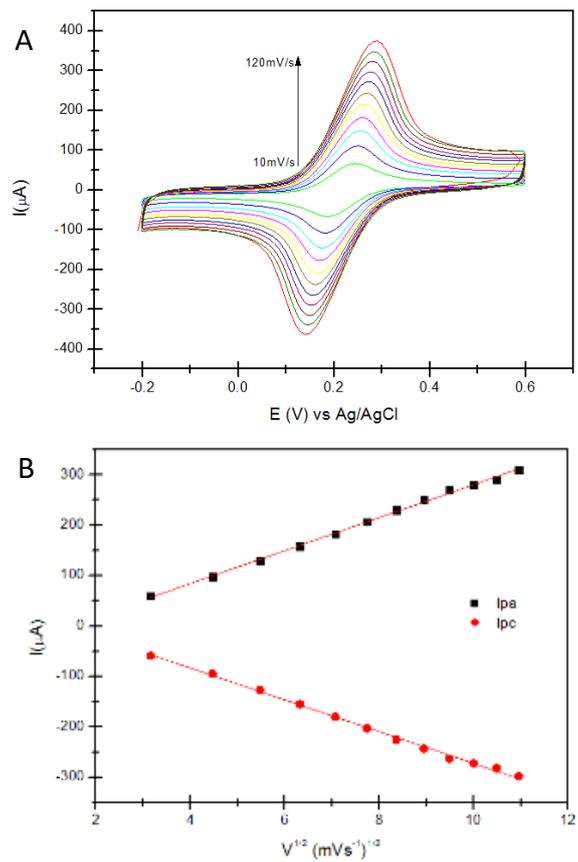


Figura 5S:

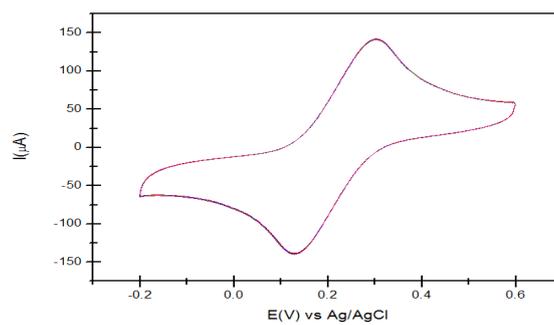
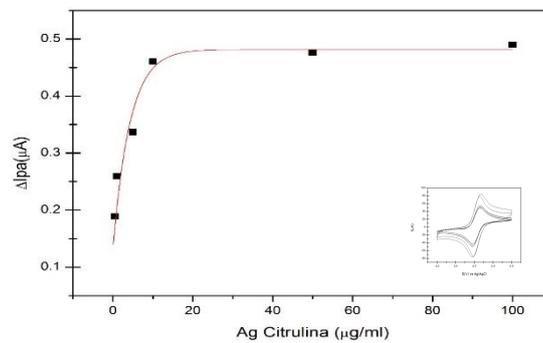


Figura 6S:**Figura 7S:**