

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA FOSFATASE
ALCALINA VISANDO A AVALIAÇÃO DE DOENÇAS CORONARIANAS**

ESTEFANI PONTES SIMÃO

RECIFE

2017

ESTEFANI PONTES SIMÃO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA FOSFATASE
ALCALINA VISANDO A AVALIAÇÃO DE DOENÇAS CORONARIANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito á obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Danielly Lima de
Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de
Andrade

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:

Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Simão, Estefani Pontes

Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para fosfatase alcalina visando a avaliação de doenças coronarianas / Estefani Pontes Simão. – Recife: O Autor, 2017.

100 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.Ciências Biológicas, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexo

Biotecnologia 2. Biossensores 3. Coronariopatias I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orient.) II. Andrade, César Augusto Souza de (coorient.) III. Título

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-298

ESTEFANI PONTES SIMÃO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA FOSFATASE
ALCALINA VISANDO A AVALIAÇÃO DE DOENÇAS CORONARIANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do
título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira/UFPE

Prof^o. Dr^o. César Augusto de Souza Andrade/UFPE

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta/UFPE

Dedico este trabalho primeiramente a ***Deus***, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai ***Alexandre***, minha mãe ***Valéria*** e ao meu irmão ***Guilherme***.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir nos meus sonhos. Mãe e Pai, a presença de vocês significou segurança e a certeza de que nunca estou sozinha nessa caminhada, vocês são os autores de todas as minhas vitórias.

Ao meu irmão Guilherme pelo apoio e paciência durante essa jornada.

À minha querida avó Maria Irenita pelo carinho e acalento nos momentos difíceis dessa etapa de minha vida.

À Fábio Maia, pelo amor, dedicação, paciência e por sua capacidade de me trazer paz em todos os momentos que passei nessa caminhada.

Aos meus orientadores, Prof^a. Maria Danielly Lima de Oliveira e Prof^o. César Augusto de Souza Andrade, pela confiança, perseverança, paciência, apoio desde o início da minha vida acadêmica, despertando e incentivando o pensamento científico. Os senhores foram essenciais em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, desde o processo seletivo até a finalização.

À todos os professores do mestrado que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados pela cooperação, em especial, ao meu amigo Isaac, que me auxiliou e contribuiu muito com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da turma do mestrado pela parceria e companheirismo desde o processo seletivo até a última disciplina obrigatória.

Aos queridos amigos que me apoiaram e incentivaram nessa jornada.

A Universidade Federal de Pernambuco e toda a sua equipe técnico-administrativa, que colaboraram para esta realização.

À CAPES pela bolsa concedida no decorrer do estudo.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA FOSFATASE ALCALINA VISANDO A AVALIAÇÃO DE DOENÇAS CORONARIANAS

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima utilizada clinicamente como indicador de algumas patologias como a osteomalácia, doença de Paget, tumores, doenças coronarianas. ALP tem um importante papel nos processos de calcificação no organismo humano, tendo em vista que ela auxilia a mineralização óssea com a deposição de cálcio e na formação dos cristais de hidroxiapatita. No presente estudo foi possível desenvolver um imunossensor impedimétrico na detecção da fosfatase alcalina sorológica em pacientes portadores de doenças coronarianas. O imunossensor foi obtido pela adsorção de cisteína (Cys) sobre a superfície do eletrodo de trabalho seguida da imobilização de nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro modificadas com cisteamina (AuCNT-cisteamina) via 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) utilizado como elementos ativadores. Em seguida, o anticorpo anti-fosfatase alcalina (AntiALP) foi imobilizado, obtendo-se o sensor Cys-AuCNT-cisteamina-AntiALP. Para caracterização de cada etapa de desenvolvimento do imunossensor e avaliação de seu reconhecimento específico foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Em adição, a microscopia de força atômica (AFM) possibilitou a análise topográfica do sistema. Devido às propriedades físico-químicas e biocompatibilidade dos nanomateriais avaliados foi possível obter uma plataforma nanoestruturada biocompatível com amplificação da área superficial e eficiente atividade eletroquímica. A interação do imunossensor com diferentes concentrações de ALP resultou em alterações nos valores das correntes de pico (anódicas e catódicas) e de resistência à transferência de carga (R_{CT}), indicando o processo de bioreconhecimento com o antígeno. O imunossensor apresentou elevada sensibilidade, seletividade e uma faixa de detecção de 0.5 a 600 UI/L de ALP, além de demonstrar sensibilidade para a biodetecção em amostras sorológicas de pacientes ateromatosos. O biossensor desenvolvido foi capaz de detectar diferentes concentrações de ALP, superando os métodos analíticos convencionais para dosagem dessa enzima. O imunossensor desenvolvido apresentou uma boa sensibilidade e especificidade para a dosagem da ALP, podendo ser aplicado no monitoramento de pacientes portadores de doenças coronarianas.

Palavras-chave: Eletroquímica. Imunossensor. Fosfatase alcalina. Nanotubos de carbono.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR FOR ALKALINE PHOSPHATASE FOR THE ASSESSMENT OF CORONARY DISEASES.

Alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme used clinically as an indicator of some pathologies such as osteomalacia, Paget's disease, tumors, coronary diseases. ALP has an important role in the processes of calcification in the human organism, since it aids bone mineralization with the deposition of calcium and in the formation of the crystals of hydroxyapatite. In the present study, it was possible to develop an impedimetric immunosensor in the detection of serum alkaline phosphatase in patients with coronary diseases. The immunosensor was obtained by the adsorption of cysteine (Cys) on the surface of the working electrode followed by the immobilization of carbon nanotubes decorated with cysteamine-modified gold nanoparticles (AuCNT-cysteamine) via 1- [3-(dimethylamino) propyl] - 3-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) used as activator elements. Then, the anti-alkaline phosphatase antibody (AntiALP) was immobilized, obtaining the Cys-AuCNT-cysteamine-AntiALP sensor. For characterization of each step of development of the immunosensor and evaluation of its specific recognition, the techniques of cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used. In addition, the atomic force microscopy (AFM) made possible the topographic analysis of the system. Due to the physico-chemical properties and biocompatibility of the evaluated nanomaterials, it was possible to obtain a biocompatible nanostructured platform with surface area amplification and efficient electrochemical activity. The interaction of the immunosensor with different concentrations of ALP resulted in alterations in the values of the peak currents (anodic and cathodic) and resistance to the transfer of charge (RCT), indicating the bioreacquisition process with the antigen. The immunosensor showed high sensitivity, selectivity and a detection range of 0.5 to 600 IU / L of ALP, besides demonstrating sensitivity for the biosensing in serological samples of atheromatous patients. The developed biosensor was able to detect different concentrations of ALP, surpassing the conventional analytical methods for the determination of this enzyme. The developed immunosensor presented a good sensitivity and specificity for the dosage of ALP, and it can be applied in the monitoring of patients with coronary diseases.

Keywords: Electrochemistry. Immunosensor. Alkaline phosphatase. Carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Fosfatase alcalina proveniente de *E.coli*.

Figura 2- Fisiopatologia do processo da calcificação óssea decorrente da alteração da homeostase da ALP.

Figura 3: Representação fisiopatológica da doença arterial coronariana, demonstrando a formação da placa aterosclerótica na artéria coronária.

Figura 4: Estrutura de um biossensor.

Figura 5: Cristal do sensor QCM com superfície de ouro.

Figura 6: Transdutor QCM.

Figura 7: Demonstração do efeito da densidade de massa no desenvolvimento de imunossensores piezoelétricos.

Figura 8: Estrutura de um imunossensor.

Figura 9: Ilustração de um anticorpo demonstrando a fração Fc e Fab da estrutura da molécula, e sítio de ligação ao antígeno da fração Fab.

Figura 10: Imobilização de anticorpos em imunossensores.

Figura 11: Representação esquemática de uma metodologia de funcionalização de superfícies de ouro com monocamadas automontadas de ditióis e AuNPs, para a ligação covalente de enzimas.

Figura 12: Demonstração da folha de grafeno (a), CNT parede simples (b), CNT múltiplas paredes (c).

Figura 13: Representação de nanotubos de carbono.

Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de ouro.

Figura 15: Diagrama de Nyquist, (a) parte imaginária e (b) parte real da impedância.

Figura 16: Voltamograma Cíclico.

Figura 17: Microscopia de força atômica.

LISTA DE FIGURAS DA PATENTE

Figura 1: Voltamograma cíclico da montagem do sistema sensor.....	56
Figura 2: Diagrama de Nyquist da montagem do sistema sensor.....	56
Figura 3: Voltamograma cíclico da detecção da fosfatase alcalina sintética.....	57
Figura 4: Diagrama de Nyquist da detecção da fosfatase alcalina sintética.....	57
Figura 5: Voltamograma cíclico da detecção da fosfatase alcalina sorológica.....	58
Figura 6: Diagrama de Nyquist da detecção da fosfatase alcalina sorológica.....	58
Figura 7: Voltamograma cíclico do controle negativo comparado a uma concentração de fosfatase alcalina sorológica.....	59
Figura 8: Diagrama de Nyquist do controle negativo comparado a uma concentração de fosfatase alcalina sorológica.....	59

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Tabela analítica demonstrando os biossensores para detecção da fosfatase alcalina.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
AntiALP	Anticorpo para fosfatase alcalina
CNT	Nanotubos de carbono (do inglês, carbon nanotubes)
AuNps	Nanopartículas de ouro
AuCNT	Nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
VC	Voltametria cíclica
Cys	Cisteína (do inglês, cystein)
Rct	Resistência a transferência de carga (do inglês, charge transfer resistance)
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, atomic force microscopy)
BSA	Soro albumina bovina (do inglês, bovine serum albumine)
EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N- Hidroxisuccinimida
HAuCl ₄	Ácido tetracloreáurico
H ₂ O	Molécula de água
NaBH ₄	Boridreto de sódio
PCR	Proteína C reativa
KCl	Cloreto de potássio
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Fosfatase Alcalina.....	18
3.1.1 Doença Arterial Coronariana	20
3.1.1.1 <i>Diagnóstico Clínico e Laboratorial</i>	21
3.2 Biossensores.....	22
3.2.1 Imunossensores Piezoelétricos	23
3.2.2 Imunossensores Eletroquímicos Nanoestruturados	25
3.2.3 Obtenção de Imunossensores por Automontagem e Modificação Covalente	28
3.2.4 Aplicação de Nanotubos de Carbono e Nanopartículas de Ouro em Imunossensores	29
3.2.5 Técnicas Eletroquímicas na Caracterização de Imunossensores	31
3.2.6 Avaliação de Superfícies Sensoras por Meio da Microscopia de Força Atômica	34
3.2.7 Biossensores para detecção da Fosfatase Alcalina	35
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 Materiais Utilizados.....	37
4.2 Síntese das AuNps.....	37
4.3 Preparação dos AuCNT.....	37
4.4 Preparação do Imunossensor.....	38
4.5 Preparação do Imunossensor Piezoelétrico.....	39
4.6 Processo de Biointeração.....	39
4.7 Análise de Especificidade.....	39
4.8 Medidas Eletroquímicas.....	40
4.9 Análises Morfológicas.....	40
5 PATENTE.....	41
6 ARTIGO.....	51
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A- IMUNOSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA DETECÇÃO DA ALP.....	88
PERSPECTIVAS	91

1 INTRODUÇÃO

As enzimas sorológicas são importantes sinalizadores de alterações no organismo humano. Dentre elas, a fosfatase alcalina (ALP) é de grande importância para o diagnóstico preditivo de diversas doenças como a osteomalácia, Doença de Paget, tumores e processos de calcificações em vasos sanguíneos de pacientes portadores de doenças cardíacas (GYURCSÁNYI et al., 2002).

A calcificação vascular é a deposição de fosfato de cálcio com a formação de cristais de hidroxiapatita nos vasos sanguíneos após o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, que favorecem o aumento da ALP (NARISAWA et al., 2007). A calcificação contribui tanto para a morbidade quanto para mortalidade dos pacientes, além de determinar alterações fisiopatológicas importantes que causam o envelhecimento vascular (LIBERMAN et al., 2013).

A ALP é um dos marcadores fenotípicos dos osteoblastos, sendo assim considerada essencial no processo de mineralização óssea (SCHOPPET; SHANAHAN, 2008). Essa enzima está presente nas células musculares lisas das artérias, participando ativamente da calcificação dos vasos sanguíneos em casos de doença arterial coronariana (NARISAWA et al., 2007).

A quantificação desta enzima é de extrema importância para identificar a presença de calcificação vascular em pacientes que são acometidos da doença arterial coronariana, pois pode levar a uma diminuição do tempo de vida destes pacientes. Diante da importância da dosagem dessa enzima, métodos de quantificação foram desenvolvidos a fim de monitorar os níveis de fosfatase alcalina.

Atualmente existem alguns métodos para identificação e quantificação da fosfatase alcalina humana, como espectrofotometria, fluorescência, quimioluminescência, eletroquímica e imunoensaios enzimáticos, porém o padrão ouro é a espectrofotometria (KIM; KWAK, 2005; ZHU; JIANG, 2007). Esses métodos apresentam algumas desvantagens como a utilização de várias etapas de processamento da amostra além da necessidade do uso de kits analíticos. Tendo em vista as desvantagens do método padrão atual, a utilização de uma nova tecnologia, como a utilização de biossensores eletroquímicos, se faz necessário para baratear e encurtar o tempo de análise da ALP.

A vantagem da utilização de biossensores eletroquímicos para detecção da ALP, em relação aos métodos tradicionais de análises, advém da capacidade de detecção da enzima em baixas concentrações (ALVARADO-GÁMEZ et al., 2014; WANG et al., 2009). Desta forma, um sistema de detecção ideal deve envolver instrumentos simples e que acople o uso de biomoléculas por meio de sistemas eletrônicos (voltamétricos e/ou impedimétricos) para o desenvolvimento de biossensores portáteis e descartáveis (BRYAN et al., 2013; CHEN et al., 2013; JIANG et al., 2013).

Os biossensores são dispositivos analíticos de baixo custo, de fácil operação e rapidez nas respostas. Nestes dispositivos, materiais de origem biológica, tais como enzimas, antígenos, anticorpos, ácidos nucleicos, dentre outros, podem ser imobilizados junto a um transdutor, seja eletroquímico, óptico, acústico, piezoelétrico. Nos imunossensores eletroquímicos a biomolécula utilizada é o anticorpo, que quando imobilizado ao transdutor eletroquímico pode ser utilizado para detecção de proteínas, biomarcadores, toxinas biológicas, análise de alimentos, meio ambiente e/ou diagnóstico clínico (LI; ZHANG; ZHANG, 2009). Para o desenvolvimento de um imunossensor sensível, compacto e estável, os anticorpos estudados podem ser orientados na superfície do eletrodo. Em adição, podem ser utilizados também algumas nanoestruturas que proporcionam um melhor desempenho dos imunossensores.

A associação entre nanoestruturas e biomoléculas é de grande interesse na biotecnologia e química bioanalítica. A utilização de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de ouro (AuNps) associadas a outra nanoestrutura como os nanotubos de carbono (CNT), por exemplo, podem melhorar o desempenho dos biossensores pelo aumento da área de superfície específica e excelente biocompatibilidade.

Os biossensores eletroquímicos utilizam das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a voltametria cíclica (VC), que têm sido amplamente aplicadas com o propósito de complementar os estudos na bioeletroquímica para desenvolvimento de biodispositivos, além de proporcionar um estudo da cinética de eletrodo e estudos da dupla camada elétrica (TRAN, 2016; HU; ZUO; YE, 2013; RUSHWORTH et al., 2014). Estas técnicas podem ser aplicadas a obtenção de informações referentes à interação entre o anticorpo e o antígeno de interesse.

Desta forma, o presente trabalho apresenta uma nova proposta para a detecção sensível da fosfatase alcalina sorológica humana utilizando um imunossensor eletroquímico baseado em uma camada automontada do aminoácido cisteína (Cys), para ligação química de nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro modificadas com cisteamina (AuCNT-cisteamina). Esta camada serviu de suporte para a imobilização do anticorpo anti-ALP. A utilização do imunossensor desenvolvido fornece suporte ao estudo de sistemas de biodetecção da ALP com aplicações em laboratórios médicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para ALP visando a avaliação de doenças coronarianas.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as AuNps;
- Fisissorção das AuNps aos CNT;
- Caracterização dos parâmetros físico-químicos das etapas de modificação da superfície do eletrodo;
- Avaliação das características eletroquímicas e piezoelétricas da nanoestrutura formado por AuCNT;
- Estudo das propriedades interfaciais da deposição de AuCNT sobre superfície de eletrodo sólido modificado com Cys (espectroscopia de EIE e VC);
- Determinação das correntes de pico anódicas e catódicas dos voltamogramas cíclicos;
- Análise topográfica do sistema sensor e das interações com o analito através da microscopia de força atômica;
- Utilização de técnicas de EIE para caracterização da interação de soro de pacientes contendo ALP.
- Determinação da capacitância da dupla camada elétrica através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga (Z_{re});

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fosfatase Alcalina

A ALP é uma enzima presente em mamíferos caracterizada por ser uma glicoproteína dimérica dependente de Zn^{+} (figura 1), inespecífica devido à capacidade de hidrolisar monoésteres de fosfato, pirofosfato, diésteres de fosfato, além de catalisar reações de transforilação (CATHALA et al., 1975). Em humanos essa enzima é essencial no processo de mineralização auxiliando na calcificação (SCHOPPET; SHANAHAN, 2008).

Figura 1: Fosfatase alcalina proveniente de *E.coli*.



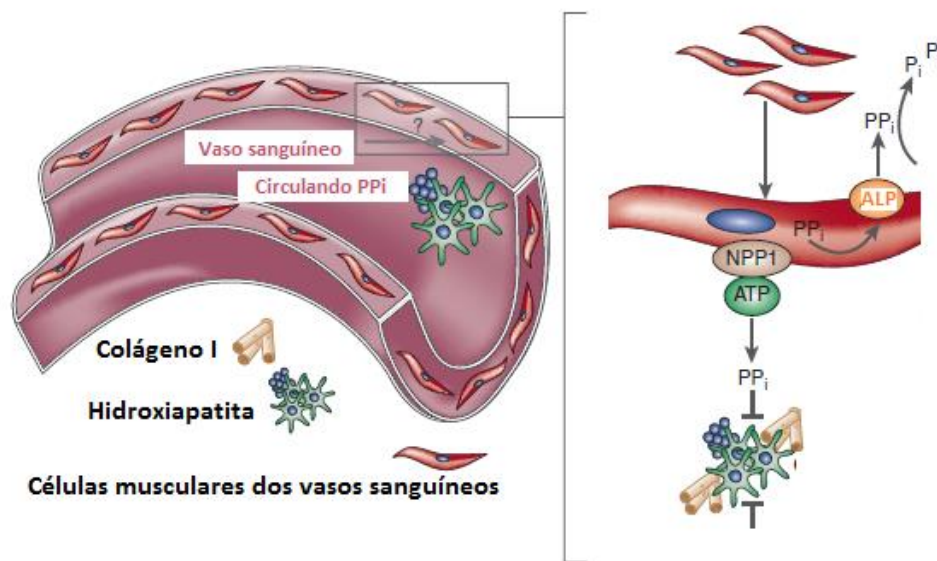
Fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/fosfatase.htm>

A ALP sorológica humana pode estar presente em células musculares lisas das artérias e em outros tipos de células como nos osteoblastos, pois esta enzima participa do processo de mineralização óssea auxiliando na deposição do fosfato de cálcio no processo de formação dos cristais de hidroxiapatita (SHIOI, 2002).

A fosfatase alcalina participa dos processos de calcificações ectópicas por ser uma enzima que se encontra ancorada nas membranas celulares, como nas células vasculares, ela pode ser estimulada pela vitamina D e pela morfogenética óssea. A principal função desta enzima é de catalisar a hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi), que tem como função se ligar aos cristais de hidroxiapatita prevenindo a incorporação de íons fosfatos a esses cristais. O aumento dessa enzima

provoca uma alteração da homeostase das células, provocando um aumento da hidrólise do PPi , uma maior incorporação de íons fosfatos aos cristais de hidroxapatita, que acaba por favorecer a osteogênese com posterior formação de calcificações nos vasos sanguíneos, como exposto na figura 2 (SCHOPPET; SHANAHAN, 2008).

Figura 2- Fisiopatologia do processo da calcificação óssea decorrente da alteração da homeostase da ALP.



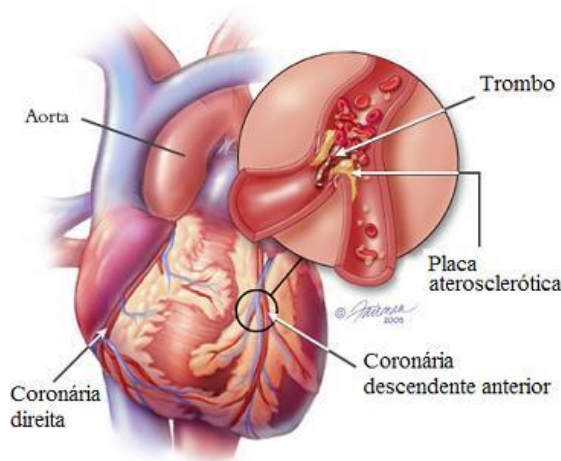
Fonte: (SCHOPPET; SHANAHAN, 2008)

Alguns estudos demonstram a relação entre o aumento da fosfatase alcalina e o processo de calcificação intravascular, os quais supõem que a inflamação vascular causada por agentes mecânicos ou o aumento do colesterol LDL com a formação de placas ateroscleróticas, pode provocar um estímulo a calcificação localizada nos vasos (JONO et al., 2000; LIBERMAN et al., 2013; SHANTOUF et al., 2009). Esse tipo de calcificação é comum em pacientes portadores de aterosclerose, inflamação vascular e doenças cardíacas (NARISAWA et al., 2007; SHIOI, 2002). Os níveis séricos de ALP variam normalmente entre 56 e 156 UI/L em adultos entre 13 e 43 UI/L em crianças (LI et al., 2013a). Alterações nos níveis séricos dessa enzima podem ser indicadores de diversas patologias como a Doença de Paget, osteomalacia, uremia, doença renal, tumores, doenças hepáticas, processos de calcificações vasculares em pacientes portadores de doenças cardíacas (KIM; KWAK, 2005; SHIOI, 2002; ZHU; JIANG, 2007).

3.1.1 Doença Arterial Coronariana

A doença arterial coronariana (DAC) é uma doença multifatorial que está relacionada a alguns fatores de risco como obesidade e pode acometer, dependendo do estilo de vida e hábitos alimentares, desde jovens a idosos. É caracterizada por uma deficiência na irrigação do coração causada pela diminuição do fluxo sanguíneo que passa pelas artérias carótidas (PINHO et al., 2010). A forma sintomática mais comum da doença geralmente é proveniente de processos ateroscleróticos que são responsáveis pela formação de barreiras que influenciam no fluxo sanguíneo arterial como demonstrado na figura 3 (ROMALDINI et al., 2004).

Figura 3: Representação fisiopatológica da doença arterial coronariana, demonstrando a formação da placa aterosclerótica na artéria coronária.



Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2007/11/infarto.JPG>

Alguns estudos apontam os principais fatores de risco para a doença arterial coronariana, entre eles estão hipertensão; diabetes; dislipidemia; histórico familiar; tabagismo; fatores hematológicos, como os níveis do fator VII; aumento dos níveis de marcadores de inflamação como a proteína C reativa (CHEQUER et al., 2006; LIMA et al., 2007). Diante da quantidade de fatores de risco predisponentes a DAC, esta doença se tornou uma preocupação para a saúde pública.

Nos dias atuais a doença arterial coronariana é reconhecida como um dos principais fatores de aumento da mortalidade e morbidade em países desenvolvidos ou em desenvolvimento industrial. Estudos concluem que quanto maior os fatores de risco predisponente a doença arterial

coronariana, maior e mais precoce é o risco de morbidade e mortalidade (CHEQUER et al., 2006; PINHO et al., 2010).

Uma das complicações que podem ocorrer durante a evolução doença é a formação de processos de calcificações vasculares (SHANTOUF et al., 2009). A calcificação vascular é diretamente relacionada com o nível de inflamação vascular, os fatores inflamatórios gerados durante o processo de formação das placas ateroscleróticas, como a liberação de radicais livres que induzem na parede endotelial da artéria a deposição de cálcio por meio dos osteoblastos, iniciando o processo de calcificação vascular (LIBERMAN et al., 2013; LIMA et al., 2007).

3.1.1.1 Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico clínico da doença arterial coronariana baseia-se principalmente na identificação da obstrução arterial pela formação de placa aterosclerótica. No passado a forma assintomática da doença era diagnosticada por testes não invasivos, pouco específicos e sensíveis onde só permitiam identificar a doença arterial coronariana obstrutiva em casos de isquemia miocárdica. Com o avanço da tecnologia, alguns testes atuais, como a angiografia realizada pela tomografia computadorizada, cintilografia aliada ao eletrocardiograma são capazes de avaliar toda extensão da anatomia coronariana, de forma específica, sensível e não invasiva possibilitando o acompanhamento da extensão e gravidade da aterosclerose coronariana (MUHLESTEIN et al., 2014).

A predisposição ao desenvolvimento da doença arterial crônica pode estar associada a obesidade, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, infarto do miocárdio, angina, hipertensão arterial e cardiopatias que aumentam os fatores de risco, morbidade e mortalidade. A associação das patologias com os exames laboratoriais e de imagem indicando a presença de obstrução nas artérias coronarianas, são indicativos da doença. (GUS et al., 2015; IZAR, 2016).

O diagnóstico laboratorial da DAC se assemelha aos diagnósticos de doenças cardiovasculares, com as dosagens de colesterol total, LDL, HDL, VLDL e triglicerídeos que estão associados a formação das placas ateroscleróticas, quantificação de alguns marcadores plasmáticos de inflamação como, proteína C reativa de alta sensibilidade, albumina amilóide sérica e fibrinogênio, além de outros marcadores sinalizadores de processos de calcificação vascular, como a fosfatase alcalina. As alterações desses parâmetros laboratoriais resultam em distúrbios metabólicos que quando associados a outras doenças, aumentam a gravidade dos aspectos clínicos

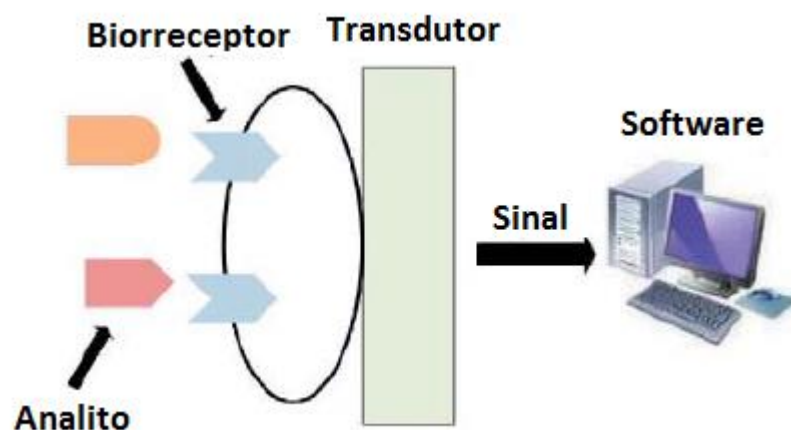
do pacientes acometidos por DAC. (LIBERMAN et al., 2013; PINHO et al., 2010; VIEIRA et al., 2011).

O diagnóstico laboratorial por meio das dosagens dos marcadores sorológicos requerem algumas etapas de processamento da amostra e uso de pelo menos dois reagentes para realização dos testes de quantificação. Para diminuir os custos e o tempo dessas quantificações se faz necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para auxiliarem no diagnóstico das doenças cardiovasculares.

3.2 Biossensores

Os biossensores são instrumentos biotecnológicos desenvolvidos com a finalidade de facilitar os procedimentos analíticos. Esses dispositivos são compostos, como ilustrado na figura 4, por um transdutor e um receptor de origem biológica, capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas específicas a respeito de um analito de interesse (THÉVENOT et al., 2001).

Figura 4: Estrutura de um biossensor.



Fonte: (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012) (adaptada).

Ao transdutor é possível imobilizar um biorreceptor, esta imobilização pode ocorrer fisicamente ou até mesmo quimicamente. Os receptores biológicos utilizados em biossensores são em sua maioria biocatalíticos (enzimas, microorganismos) ou bioligantes (lectinas, proteínas, DNA,

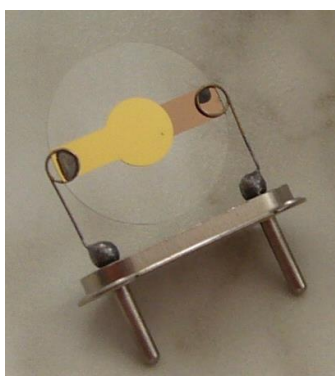
RNA) que interagem especificamente com a molécula alvo, essa interação é capaz de provocar uma reação bioquímica traduzida em um sinal mensurável (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012; SCHELLER; SCHUBERT, 1992). Os sinais resultantes da reação podem ser ópticos, magnéticos, acústicos, piezoelétricos, elétricos, eletroquímicos (amperométricos e potenciométricos) que irá depender do transdutor utilizado.

Esses dispositivos podem ser aplicados na indústria de alimentos como no controle de toxinas alimentares (GUO et al., 2014; VASILESCU et al., 2016), diagnóstico clínico na identificação de diversas doenças (CORTINA et al., 2016; CUNG et al., 2015; LUO et al., 2015), proteção ao meio ambiente através da identificação de contaminantes (BIDMANOVA et al., 2016; RAMNANI; SAUCEDO; MULCHANDANI, 2016), desenvolvimento de drogas e na área forense (POLO; TOFFOLI, 2016; WANG et al., 2015).

3.2.1 Imunossensores Piezoelétricos

O efeito piezoelétrico é foi descoberto pelos físicos Jacques Curie e Pierre Curie em 1880. Baseia-se principalmente na pressão e na eletricidade sobre um cristal resultando no efeito piezoelétrico. O cristal piezoelétrico é a base na qual existe uma lâmina de ouro onde poderão ser imobilizadas algumas moléculas, como anticorpos no caso de desenvolvimento de imunossensores, como demonstrado na figura 5. A aplicação de uma corrente na superfície do cristal piezoelétrico é capaz promover uma frequência de oscilação mecânica que se propaga no cristal, resultando no efeito piezoelétrico (POHANKA, 2017; SAAD et al., 2014).

Figura 5: Cristal do sensor QCM com superfície de ouro.

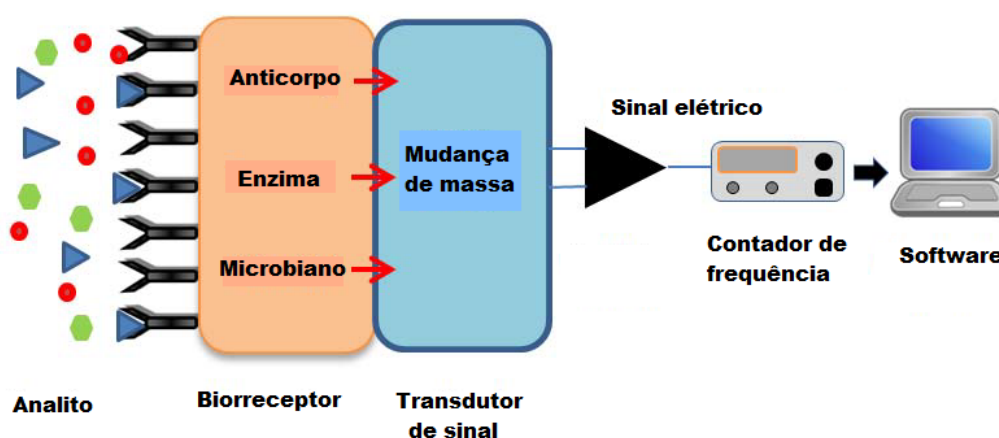


Fonte: (POHANKA, 2017).

A técnica de QCM (Quartz Crystal Microbalance), ao qual é baseada no efeito piezoelétrico, é classificada como transdutor acústico capaz de detectar a alteração de densidade de massa. O QCM é uma técnica bastante útil no desenvolvimento de biossensores, sendo bastante eficiente no desempenho desses dispositivos, devido a alta precisão, apresentando a capacidade de detectar massas manométricas (CHAUHAN et al., 2016; ROCHA-SANTOS, 2014; SKLÁDAL, 2016).

Os biossensores piezoelétricos são bastante utilizados para a determinação de diversos analitos, essa análise é possível através da resposta piezoelétrica determinada pela diminuição da frequência de oscilação do cristal resultante do processo de adsorção das moléculas a superfície do cristal (FARKA; KOVÁŘ; SKLÁDAL, 2015). O sinal obtido do sensor piezoelétrico é condicionado a funcionalização da superfície do cristal favorecendo a ligação de diversos biorreceptores (anticorpos, lectinas, DNA, aptâmeros, enzimas, microbiano), como ilustrado na figura 6 (KIM; CHOI, 2014; LIN; CHEN; CHEN, 2013; MORRIS et al., 2014; WANG et al., 2017).

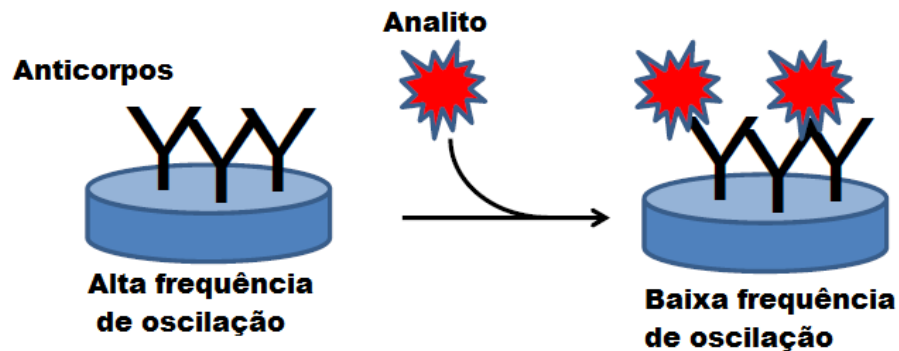
Figura 6: Transdutor QCM.



Fonte: (SAAD et al., 2014) (adaptado)

Os anticorpos são moléculas biorreceptoras que apresentam uma boa resposta piezoelétrica devido a boa funcionalização dessa proteína na superfície sensora. Nos sensores piezoelétricos pode-se identificar a interação entre antígeno e anticorpos por meio da diminuição da frequência de oscilação do cristal, resultante do aumento da massa na superfície com a formação do imunocomplexo (figura 7). Os imunossensores piezoelétricos ganham destaque na literatura devido a boa sensibilidade e biocompatibilização (POHANKA, 2017; YUAN; CHEN; LI, 2016).

Figura 7: Demonstração do efeito da densidade de massa no desenvolvimento de imunossensores piezoelétricos.

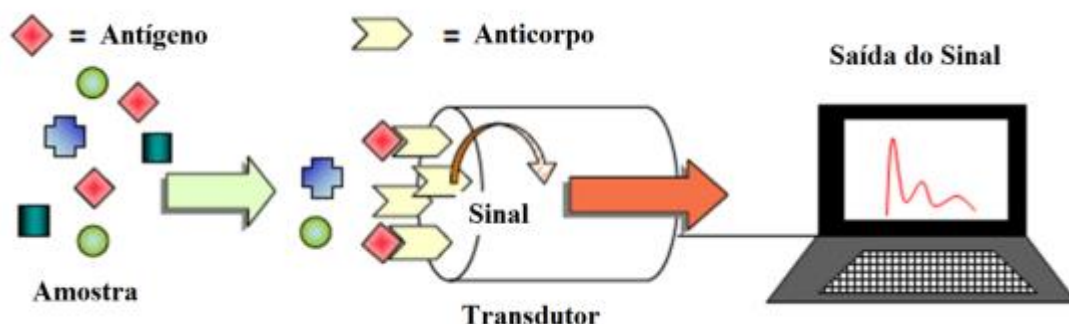


Fonte: (POHANKA, 2017) (adaptado).

3.2.2 Imunossensores Eletroquímicos Nanoestruturados

Dentre a classe de biossensores, os imunossensores se destacam por serem dispositivos baseados em reações imunológicas onde é possível identificar as interações entre antígenos-anticorpos. Este tipo de imunoensaio está entre as mais importantes ferramentas utilizadas no diagnóstico clínico de doenças, análises ambientais e medicina forense nos últimos 30 anos (figura 8) (KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016; WANG, 2001).

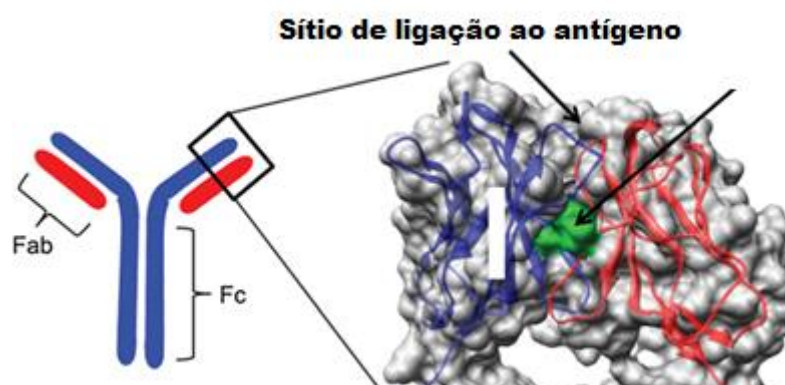
Figura 8: Estrutura de um imunossensor.



Fonte: FIGUEIREDO, 2013.

Os anticorpos são proteínas globulares complexas produzidas pelo organismo contra algum microorganismo ou agente estranho ao organismo (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). Essas proteínas são formadas pela união de diversos aminoácidos em uma sequência específica, estruturadas em duas frações sendo elas Fab e Fc, como ilustrado na figura 9 (LIU; YU, 2016; WANG, 2001).

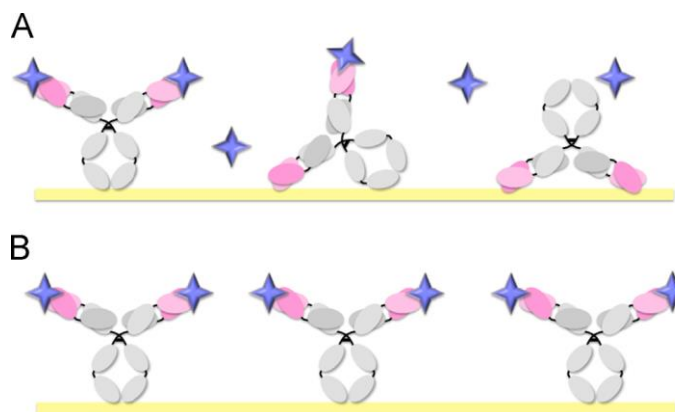
Figura 9: Ilustração de um anticorpo demonstrando a fração Fc e Fab da estrutura da molécula, destacando o sítio de ligação ao antígeno da fração Fab.



Fonte: (LIU; YU, 2016) (adaptada).

A fração Fab é capaz de se associar com uma molécula alvo específica de alta afinidade, já a porção Fc do anticorpo é geralmente utilizada para orientação das frações Fab facilitando a identificação do antígeno quando imobilizados em plataformas sensoras (figura 9). A figura “10A” representa a orientação aleatória do anticorpo na plataforma do biossensor e em “10B” observa-se a imobilização específica e direta, por meio de interações químicas ou físicas na plataforma do biossensor (LIU; YU, 2016; MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013).

Figura 10: Imobilização de anticorpos em imunossensores.



Fonte: (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013).

Nos imunossensores eletroquímicos o processo de interação e biorreconhecimento entre anticorpos e antígenos são capazes de provocar alterações na corrente do sistema proporcionais a quantidade de interações entre antígeno- anticorpo, sendo assim uma boa ferramenta para análise deste tipo de interação (KAUSAITE-MINKSTIMIENE et al., 2010).

Atualmente os imunossensores estão sendo utilizados como uma alternativa para melhorar a sensibilidade de processos analíticos, considerando que a associação de anticorpos e nanomateriais apresentam um eficiente melhoramento no desempenho de biossensores (LIM; AHMED, 2016).

Os imunossensores nanoestruturados possuem em sua base estrutural os nanomateriais, entre eles estão as nanopartículas metálicas, nanopartículas condutoras como as nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, nanofolhas de grafeno que são capazes de aumentar a superfície de ligação dos receptores biológicos no biossensor (KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016; LI et al., 2013a; YOLA; ATAR, 2014).

Os nanomateriais podem ser adsorvidos as plataformas dos sensores por processos de quimissorção e fisissorção. A quimissorção é caracterizada pela ligação química entre a plataforma do biossensor e o nanomaterial, essa ligação é baseada na troca ou transferência de carga entre uma molécula e outra. A fisissorção, diferente da quimissorção, não envolve nenhuma ligação química, pois a ligação nesse processo é baseada em dipolo e interações de Van der Waals entre o nanomaterial e a plataforma do sensor. Ambas as ligações podem provocar mudanças na resistividade de sensores eletroquímicos sinalizando a ligação do nanomaterial (CALVI et al., 2016; SCHMIDT et al., 2015).

Os imunossensores eletroquímicos são biossensores que possuem um transdutor eletroquímico revestido por filme iônico, material condutor ou semi-condutor capaz de imobilizar anticorpos a plataforma do biossensor, através da qual é possível se obter informações analíticas proveniente do reconhecimento de um elemento biológico ou não biológico (SEENIVASAN et al., 2015; WANG; SHEN; YU, 2008). Os sensores eletroquímicos são uma subclasse dos sensores químicos, os quais utilizam um eletrodo como transdutor, onde será imobilizado o material de origem biológica capaz de reconhecer um analito específico e gerar um sinal potenciométrico ou amperométricos (WANG, 2001).

Os sinais amperométricos são caracterizados de uma corrente resultante de um processo de oxidação ou redução eletroquímica de uma solução eletroativa, esse sinal é diretamente proporcional a concentração das espécies eletroativas acopladas ao transdutor. Os sinais potenciométricos são baseados na diferença de potencial existente entre três eletrodos sendo um eletrodo íons seletivo e dois eletrodos de (THÉVENOT et al., 2001; WANG, 2001). As técnicas de voltametria cíclica (amperométrica) e espectroscopia de impedância eletroquímica (potenciométrica) são têm sido amplamente aplicadas com o propósito de complementar os estudos na bioeletroquímica para desenvolvimento de biodispositivos (KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016; REZAEI NIYA; HOORFAR, 2013).

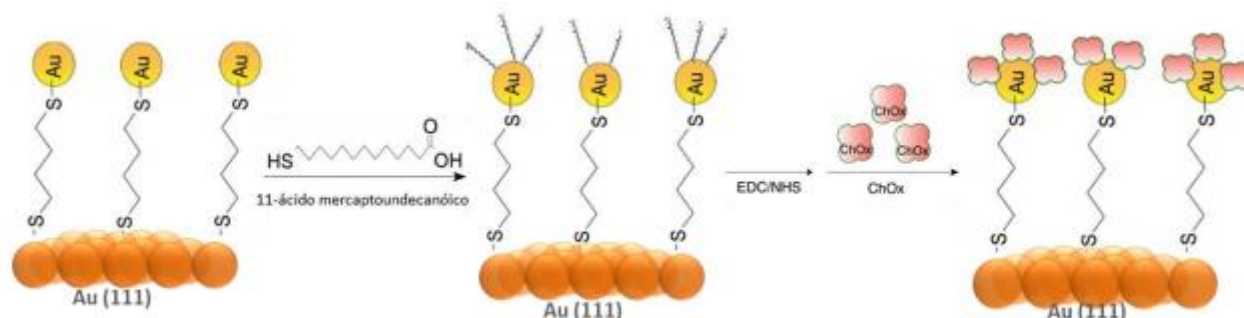
3.2.3 Obtenção de Imunossensores por Automontagem e Modificação Covalente

Os imunossensores podem ser desenvolvidos por meio de camadas automontadas que são formadas por alguns tipos de moléculas, como cadeia de átomo de carbono, capazes de promover uma maior estabilidade à superfície do sensor, os aminoácidos como a cisteína e cisteamina são capazes de modificar a superfície do sensor fornecendo grupos carboxílicos para interagir com outra molécula como anticorpos através dos grupos aminos presentes nessa proteína (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013).

A interação entre os átomos de carbono e o grupos aminos só são possíveis por meio de um agentes ligantes como o 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-Hidroxisuccinimida (NHS) ou glutaraldeído, capaz de ativar os grupos carboxílicos ou aminos respectivamente, presentes em camadas automontadas, favorecendo uma ligação covalente entre as moléculas adsorvidas a superfície do eletrodo a outras que serão adicionadas posteriormente, como demonstrado na figura 11, onde foi possível ligar às nanopartículas de ouro modificadas quimicamente com ácido mercaptobenzóico a superfície de ouro do eletrodo, assim como após a

adsorção desse nanomaterial a superfície, foi possível ligar as enzimas por meio de um agente acoplador que foi o EDC:NHS (KAUSAITE-MINKSTIMIENE et al., 2010; LUNA et al., 2015; SIMÃO et al., 2016).

Figura 11: Representação esquemática de uma metodologia de funcionalização de superfícies de ouro com monocamadas automontadas de ditióis e AuNPs, para a ligação covalente de enzimas.



Fonte: (ALMEIDA, 2016)

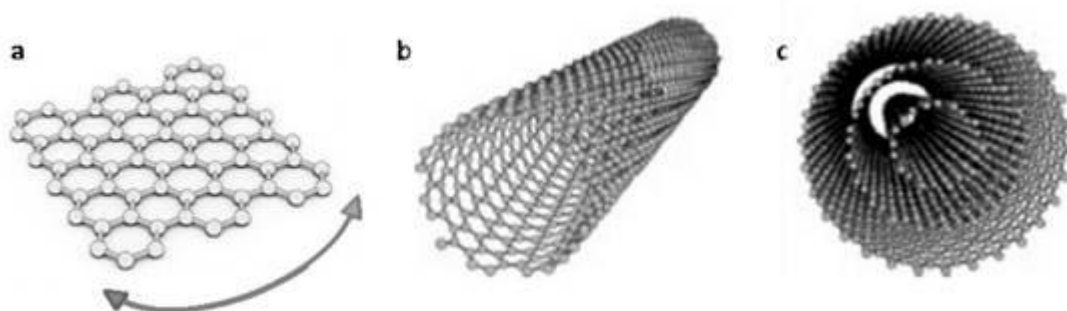
As ligações covalentes proporcionam uma maior estabilidade entre as ligações existentes no sistema sensor quando comparada a ligações eletrostáticas por exemplo, possibilitando o processo de reutilização do biossensor (LIU; YU, 2016).

3.2.3 Aplicação de Nanotubos de Carbono e Nanopartículas de Ouro em Imunossensores

Os nanotubos de carbono (CNT) são nanomateriais compostos por folhas de grafeno enroladas formando tubos ocos (figura 12), que possuem uma boa atividade eletrocatalítica, alta biocompatibilidade e uma rápida cinética de transferência de elétrons em comparação com outros nanomateriais utilizados em biossensores, essas características intrínsecas aos nanotubos são bastante favoráveis para a utilização desses materiais em imunossensores eletroquímicos (YANG et al., 2015).

Os CNT podem ser caracterizados como nanotubos de parede simples, compostos somente por uma folha de grafeno em formato de tubo (figura 12a); ou de múltiplas paredes, formados por mais de uma folha de grafeno (figura 12c). A diferença entre as duas estruturas no âmbito da utilização para sensores eletroquímicos se dá pela maior condutibilidade de elétrons que é característico dos nanotubos de múltiplas paredes. Por isso essa classe de CNT são mais utilizadas principalmente em sensores eletroquímicos.

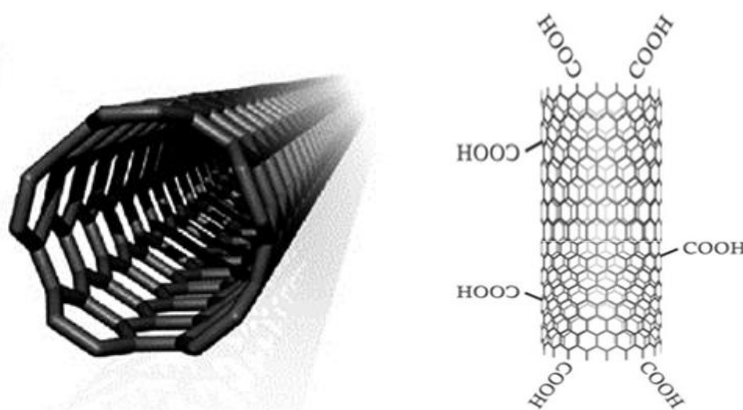
Figura 12: Demonstração da folha de grafeno (a), CNT parede simples (b), CNT múltiplas paredes (c).



Fonte: (MACHADO et al., 2014).

Outra característica dos CNT é a possibilidade de funcionalização química dessas nanoestruturas, como demonstrado na figura 13, essa vantagem possibilita uma alternativa para promover uma maior estabilidade no desenvolvimento de biossensores, pela possibilidade de correrem ligações covalentes entre as moléculas acopladas aos CNT do biossensor (CALVI et al., 2016; LAMBERTI; GIOMO; ELVASSORE, 2011).

Figura 13: Representação de nanotubos de carbono.

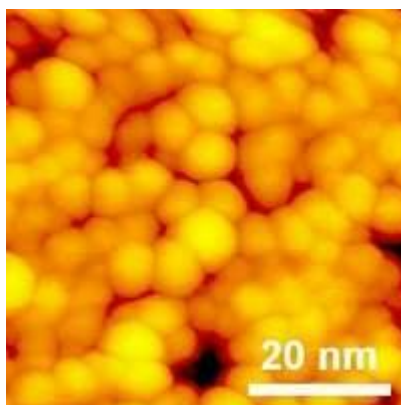


Fonte: (LIM; AHMED, 2016; TARAWNEH; AHMAD; 2013).

As nanopartículas de ouro (AuNps) são esferas de ouro (figura 14) com grande densidade de elétrons na superfície, facilmente sintetizadas, capazes de promover uma amplificação do sinal

eletroquímico, e dispõem de área superficial adequada para uma eficiente bioconjugação, biofuncionalização além de uma boa estabilidade no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (LIM; AHMED, 2016; YOLA; ATAR, 2014). A associação de nanotubos de carbono à nanopartículas de ouro funcionalizadas apresentam ser uma boa alternativa no desenvolvimento de biossensores nanoestruturados, aumentando a área de superfície para os processos de modificação (LAMBERTI; GIOMO; ELVASSORE, 2011; LIU et al., 2008).

Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de ouro.



Fonte: <http://pharmagistral.blogspot.com.br/2013/05/o-perigo-das-nanoparticulas-de-ouro.html>

3.2.4 Técnicas Eletroquímicas na Caracterização de Imunossensores

A voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica são técnicas muito úteis no desenvolvimento de imunossensores, devido a alta sensibilidade, baixo custo e possibilidade de miniaturização do instrumento (RANDVIIR et al., 2013; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

A EIE baseia-se na aplicação de um pequeno potencial AC em função do tempo para medir a corrente gerada. Nesta técnica é possível avaliar a interação entre as biomoléculas no desenvolvimento de biossensores por meio da variação das correntes geradas durante as etapas de montagem e biointeração do biossensor e o analito alvo. É possível observar essas respostas através do Diagrama de Nyquist que é a forma mais habitual de representação do espectro de impedância, neste gráfico a componente imaginária (capacitiva) da impedância é graficamente representada *versus* a componente real (resistiva) como é possível observar na figura 15, esta técnica demonstra

por meio de variações no diâmetro dos semi-círculos a variação de frequência durante cada processo (REZAEI NIYA; HOORFAR, 2013).

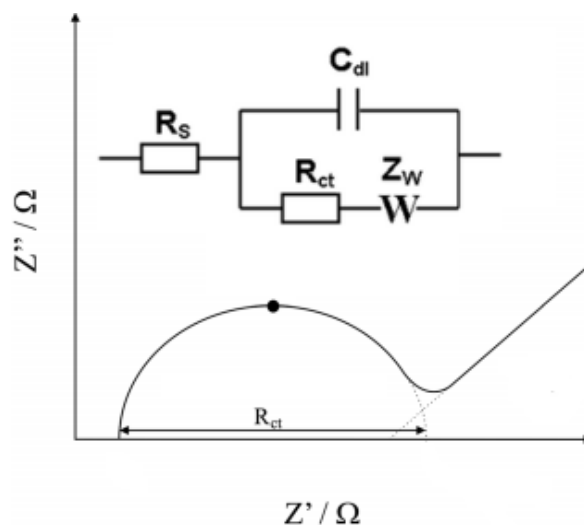
O cálculo teórico da impedância é resultado da perturbação de um circuito elétrico, representado graficamente por duas componentes Z' e Z'' , resultantes da equação:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2} \text{ e } Z'' = \frac{\omega C_{ct} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2}$$

R_{Ω} (resistência da solução); ω (frequência angular), C_d (capacitância da dupla camada elétrica), R_{ct} (resistência a transferência de carga)

Por meio deste cálculo é possível avaliar o comportamento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) da interface eletrodo- solução em altas e baixas frequências (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; LASIA, 1999). As componentes da impedância são apresentadas na forma de circuito para facilitar o entendimento dos componentes da impedância geral, onde também são utilizados para simulações computacionais de impedâncias de sistemas diversos. Nos experimentos eletroquímicos a impedância resultará das componentes de resistência da solução (R_s), capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), resistência a transferência de carga (R_{ct}) e o elemento de Warburg (Z_w) como demonstrado no circuito inserido na fig 15. A combinação desses elementos é chamado de circuito de Randles, um dos circuitos mais utilizados para simulações com EIE.

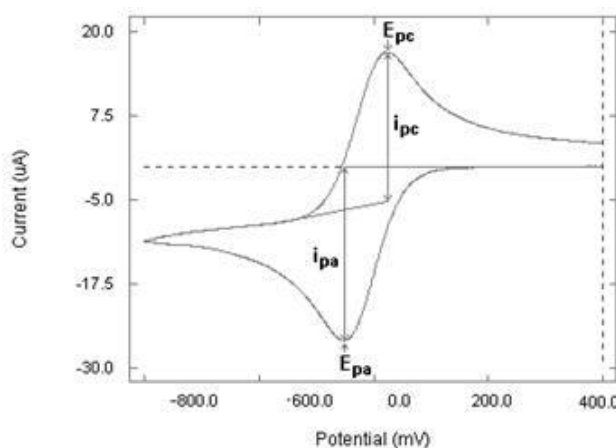
Figura 15: Diagrama de Nyquist, (Z'') parte imaginária e (Z') parte real da impedância.



Fonte: (RANDVIIR; BANKS, 2013) (adaptado).

A VC é uma técnica útil que fornece informação da interface do eletrodo biologicamente modificado, permitindo a monitoração da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução, essa técnica é usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, além de permitir avaliar a magnitude relativa da corrente gerada por transferência de elétrons durante o processo redox com a quantidade do analito presente na interface eletrodo-solução (BARD et al., 1944). Nessa técnica o Voltamograma Cíclico é a representação gráfica da corrente *versus* potencial onde é possível identificar picos de oxidação (i_{pa}) e redução (i_{pc}) durante cada etapa de processamento do biossensor, esses picos irão representar o processo redox na interface eletrodo- solução (figura 16).

Figura 16: Voltamograma Cíclico.



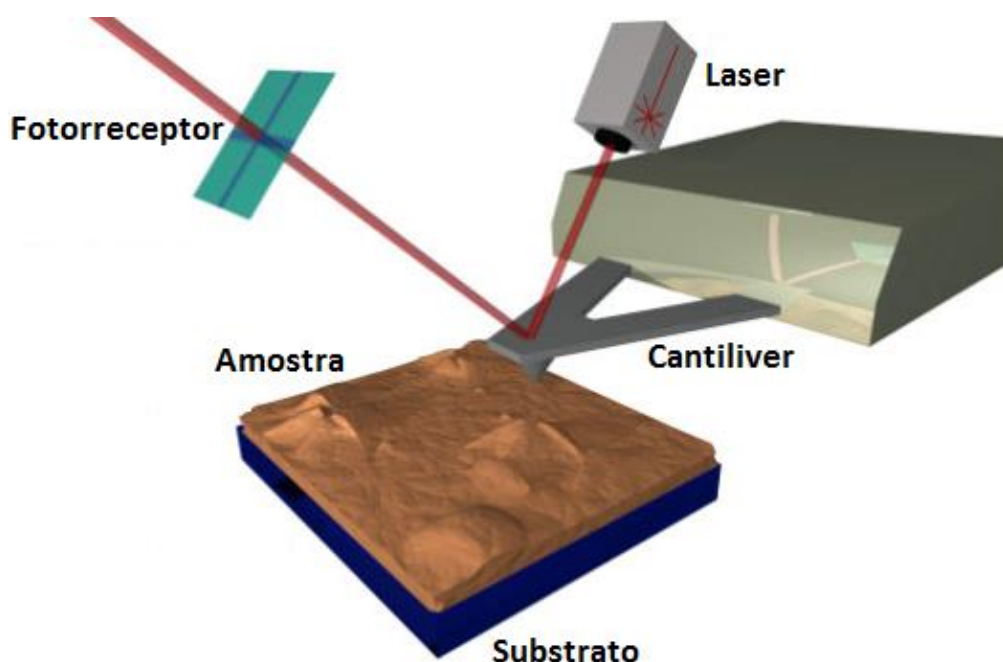
Fonte: ANGEL, 2014.

As técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas para obtenção de informações referentes á interação entre camadas sensora e analito de interesse médico, isso se deve ao potencial dessa ferramenta de amplificar o sinal eletroquímico, possibilitando uma maior sensibilidade desses biodispositivos. Alguns biossensores aliam a utilização das técnicas eletroquímicas a nanomateriais, como nanopartículas de ouro, de óxido de zinco, grafeno, nanotubos de carbono, para otimizar o desempenho dos biossensores aumentando a superfície para imobilização de biomoléculas como anticorpos, lectinas, oligonucleotídeos.(BRYAN et al., 2013; GUPTA et al., 2016; HU; ZUO; YE, 2013; KAVOSI et al., 2015; RUSHWORTH et al., 2014).

3.2.5 Avaliação de Superfícies Sensoras por Meio da Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica útil para análise de superfície, proporcionando uma alta resolução de estruturas atômicas e nanométricas. A formação da imagem no AFM se dá pela interação de uma sonda sobre a superfície da amostra onde se detecta as forças mecânicas universais presentes entre a ponta da sonda (microcantiliveres) e a amostra (figura 17) (YAO; WANG, 2005).

Figura 17: Microscopia de força atômica.



Fonte: <http://www.education.mrsec.wisc.edu/nanoquest/afm/index.html>

No desenvolvimento de biossensores, são utilizados microcantiliveres que são capazes de varrer a superfície do biossensor identificando por exemplo, a ligação específica de biomoléculas para detecção analítica, isso ocorre pois os microcantiliveres podem mudar a sua frequência vibratória ou sofrer deformação sobre moléculas na sua superfície do sensor, essa mudança na frequência é detectada e pode ser utilizada para medir viscosidade, densidade e fluxo de vários sistemas (STEFFENS et al., 2012).

A AFM é uma ferramenta útil na caracterização durante do desenvolvimento de sensores, pois, por meio desta técnica é possível observar modificações no relevo da superfície do biossensor durante cada processo de montagem do sistema, comparados com os resultados obtidos com as

técnicas eletroquímicas. A microscopia é um complemento ao processo de caracterização de um biossensor, tendo em vista que as técnicas eletroquímicas podem fornecer informações a respeito da variação de resposta elétrica do sistema, durante todo o processo de desenvolvimento do sensor, a AFM pode auxiliar com caracterização morfológica da superfície do sensor, tanto durante o processo de montagem como no biorreconhecimento do analito alvo, como demonstrado por Singh et al. (2014). (CANBAZ; SEZGINTÜRK, 2014; SINGH; SHARMA; JANG, 2014)

3.2.6 Biossensores para detecção da fosfatase alcalina

Nos dias atuais os biossensores têm sido muito utilizados nas análises clínicas laboratoriais, no monitoramento e auxílio no diagnóstico de diversas doenças devido a praticidade e o baixo custo desse método analítico.

Alguns biossensores já foram relatados na literatura demonstrando sensibilidade à fosfatase alcalina (tabela 1). Dentre eles se destacam os biossensores colorimétricos, eletroquímicos, amperométricos, fluorimétricos, porém só alguns deles apresentam nanomateriais em sua estrutura. Como demonstrado na tabela 1, o nanomaterial que se destaca no desenvolvimento de sensores para detecção da fosfatase alcalina são as nanopartículas de ouro, este fato se deve as propriedades condutoras desse material influenciando nos sinais eletroquímicos gerados nesses biossensores (LIM; AHMED, 2016)

Tabela 1: Tabela analítica demonstrando os biossensores para detecção da fosfatase alcalina e o trabalho apresentado

	Plataforma	Técnicas	Referências
Detecção da fosfatase alcalina	Nanopartícula de ouro conjugada a adenosina trifosfato (AuNP / ATP)	Colorimétrica	(LI et al., 2013a)
	Substrato 8-Quinolyl phosphate (QP)	Fluorimétrico	(ZHU; JIANG, 2007)
	Monocamada auto-montada de péptidos fosforilados (Cys-Pro-pTyr-NH ₂)	Eletroquímica	(ZHANG; LIU; XIA, 2013)

	Hidrogel	Amperométrica	(GYURCSÁNYI et al., 2002)
	Nanopartículas de ouro e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).	Espalhamento de Raman intensificado por superfícies (SERS)	(RUAN; WANG; GU, 2006)
	Nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro	Eletroquímica	Presente trabalho

O presente trabalho apresenta uma nova plataforma sensora baseada em nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro modificadas com cisteamina a qual se liga covalentemente a anticorpos anti-ALP para detecção da ALP. O nanocomplexo formado pelos AuCNT é capaz de aumentar o sinal eletroquímico do sistema, favorecendo a transferência de elétrons, proporcionando uma maior sensibilidade do imunossensor. O nanocomplexo é uma inovação na utilização em imunossensores para detecção de ALP.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais Utilizados

Fosfatase alcalina (ALP), anticorpos para fosfatase alcalina (Anti-ALP), nanotubos de carbono (CNT), ferro-ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, soro albumina bovina (BSA), cisteína, cisteamina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N- Hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma Chemical. Todos os produtos químicos e solventes de grau analítico, foram utilizados como recebidos sem purificação adicional.

4.2 Síntese das AuNPS

A metodologia utilizada para síntese das nanopartículas foi descrita por Shi et al em 2009. Inicialmente, 0,5 mL de uma solução aquosa de 0,01 M $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ foi misturado com 0,5 mL de uma solução aquosa a 0,01 M de citrato trissódico e 18,4 mL de água deionizada. Essa mistura foi realizada sob refrigeração. Em seguida foi adicionado a mistura 0,6 mL de uma solução de $NaBH_4$ a 0,1 M sob agitação. Após a agitação foi possível observar a mudança da coloração da mistura se aproximando da cor rosa indicando a formação das nanopartículas de ouro.

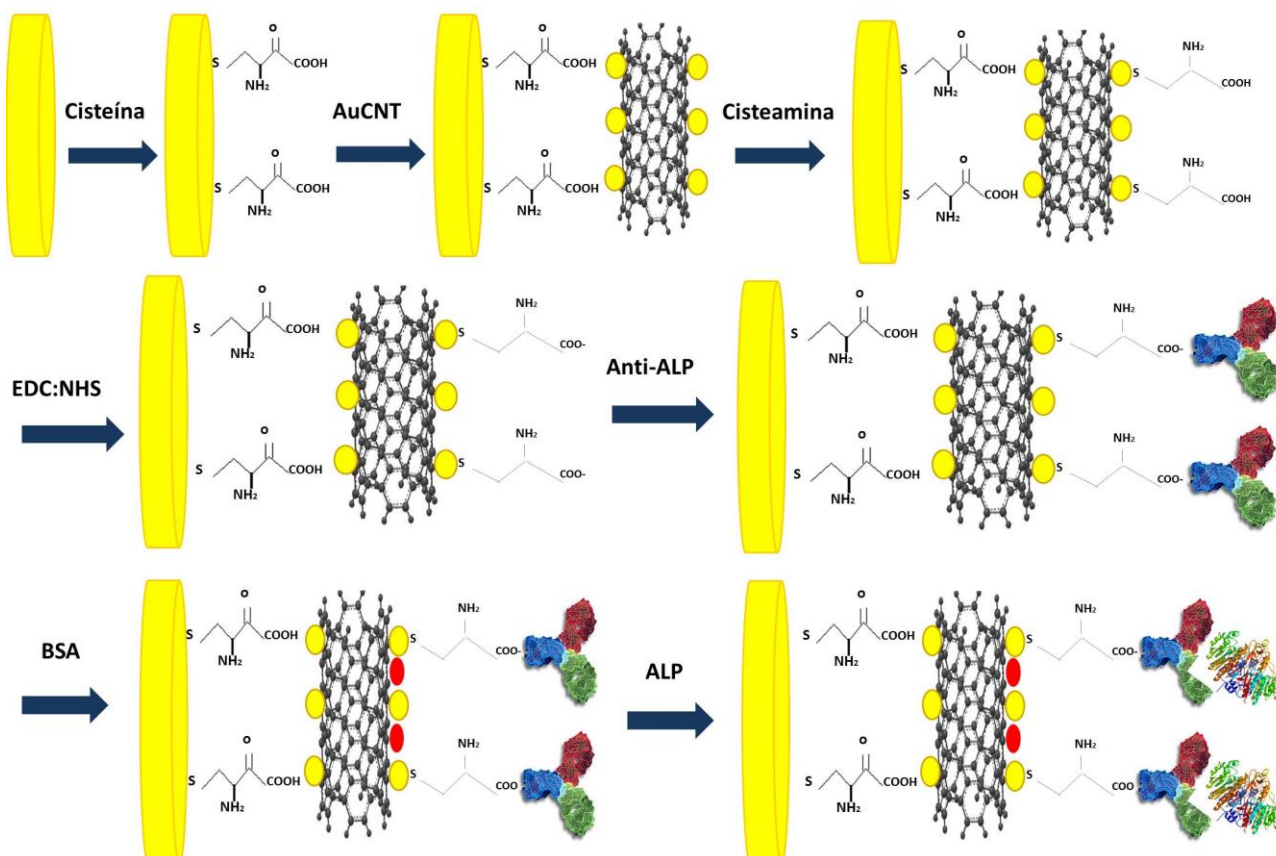
4.3 Preparação das AuCNT

A formação do nanocomplexo formado pelos CNT e as AuNPs foi realizado segundo a metodologia utilizada por Shi et al em 2009. Inicialmente, foi realizada a mistura de 9,3 mg de CNT e 10 mL da solução de nanopartículas de ouro sintetizada anteriormente. Após a mistura dos nanomateriais, foi adicionado a mistura 6 mL de etanol sob agitação vigorosa e posteriormente sonicada por 10 minutos. A adição do etanol foi capaz de diminuir a tensão superficial entre os nanotubos de carbono e a água favorecendo a adsorção física das nanopartículas de ouro aos nanotubos de carbono. A mistura foi agitada por 10 horas e logo em seguida foi submetida a 5 ciclos de lavagem com água deionizada, a cada ciclo de lavagem a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm. Após as lavagens a amostra obtida secou a temperatura de 70°C.

4.4 Preparação do Imunossensor Eletroquímico

O eletrodo de ouro foi polido em alumina por 1 minuto, enxaguado em água deionizada e secou-se em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a superfície do eletrodo 5 μ L de cisteína a 70mM por 10 minutos para modificar a superfície do eletrodo. Posteriormente os 5 μ L de AuCNT foi adicionada a superfície do eletrodo modificado por 30 minutos. Após a ligação do nanocomplexo, foi adicionado ao sistema 70mM de cisteamina que foi capaz de modificar quimicamente as nanopartículas de ouro para posterior ligação dos anticorpos. Para ativar os grupos carboxílicos da cisteamina e promover a ligação do anticorpo ao biossensor, foi adicionado 2mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ 5mM N- Hidroxisuccinimida (NHS) numa proporção de 1: 1 em tampão acetato (pH 5.0) por 2 horas. Após a ativação foi possível adicionar 225 μ g/mL de anticorpos monoclonais (Anti-ALP) ao sistema sensor que foi incubado por 10 minutos. Após adicionar o anticorpo se fez necessário a adição de soro albumina bovina (BSA), para bloquear os sítios remanescentes ainda ativos (figura 1). Em adição, foi realizado um enxague com água deionizada a cada etapa de montagem do imunossensor

Figura 1: Representação esquemática do biossensor desenvolvido.



4.5 Preparação do Imunossensor Piezoelétrico

O disco de ouro do cristal de quartzo foi adicionado em uma solução de clorofórmio por 5 minutos e enxaguado com água deionizada. Após o processo de limpeza, secou a temperatura ambiente e posteriormente foi aquecido na célula do QCM por 15 minutos. Após o aquecimento foi adicionado ao disco 30µL de cisteína [70mM] por 20 minutos, posteriormente foi adicionado 30µL AuCNT por 20 minutos, em seguida foi adicionado 30µL de cisteamina [70mM] por 10 minutos. Para promover a ativação da cisteamina, para posterior imobilização dos anticorpos, foi adicionado o 30µL de EDC:NHS por 10 minutos. O antiALP foi adsorvido ao sistema por 15 minutos em seguida foi adicionado o BSA por 5 minutos. Em seguida o sensor foi exposto às concentrações de 0,5; 50; 100; 400; 600 UI/L, foi utilizado 60µL de cada concentração de ALP por 15 min. Após cada etapa de montagem foi realizado o enxague do disco com água deionizada para eliminar as moléculas não aderidas.

4.6 Processo de Biointeração

O sensor foi exposto a diversas concentrações de ALP sintética e sorológica humana. As concentrações analisadas variaram de 0.5 a 600 UI/L. Os estudos das concentrações de ALP tiveram como base a necessidade de desenvolver um biossensor capaz de superar os limites de detecção de técnicas convencionais utilizadas para dosagens da enzima em amostras de soro humano, dispensando a diluição de amostras com concentrações acima de 400 UI/L. Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram dosadas pelo método de espectrofotometria antes de serem submetidas a dosagem pelo imunossensor desenvolvido.

4.7 Análise de Especificidade

O imunossensor desenvolvido neste estudo foi exposto a uma concentração de 20mg/dL de proteína C reativa (PCR) sorológica para realização do teste de especificidade. Nesse estudo é possível avaliar a interação específica do anticorpo Anti-ALP com a ALP frente à elevada concentração de outro marcador sorológico inflamatório.

4.8 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no PGSTAT 128N potentiostato/galvanostatato (Autolab, The Netherlands) com três eletrodos e uma célula eletroquímica convencional contendo um eletrodo com fio de platina como eletrodo auxiliar, um eletrodo Ag/AgCl saturado com uma solução KCl como eletrodo de referência, um eletrodo de trabalho com disco de ouro com 2mm de diâmetro. Todos os experimentos foram realizados na presença de 10mM de uma solução eletrolítica de ferro-ferricianeto de potássio [1:1]. Os dados do Nyquist foram obtidos numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100kHz com um potencial aplicado de 10 mV. A VC foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7 V em uma velocidade de varredura de 50mVs⁻¹.

4.7 Análises Morfológicas

A análise morfológica do imunossensor desenvolvido foi realizada por meio da técnica de microscopia de força atômica (AFM). Foram utilizados um microscópio de força atômica (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japão) e cantilevers de sílica como sonda para análise morfológica da superfície do imunossensor, realizada de modo não contato à temperatura ambiente. As imagens foram extraídas em uma faixa de varredura de 1,0 Hz em uma área de 5,0 × 5,0 μm e posteriormente analisadas usando o software AFM Gwyddion.

5 PATENTE

O presente capítulo apresenta a patente titulada “DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA” depositada dia 08/09/2016 sob o número de processo BR 10 2016 020702 9.

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

01. Campo da invenção

A detecção de fosfatase alcalina (ALP) em amostras biológicas é de extrema importância como auxílio no diagnóstico de diversas doenças, porém os métodos utilizados atualmente para a identificação dessa enzima sorológica humana exigem várias etapas de processamento da amostra, além de uma escala de detecção limitada. Diante de algumas limitações para a detecção da fosfatase alcalina, os biossensores eletroquímicos são uma alternativa para o diagnóstico laboratorial devido a sua capacidade de miniaturização e baixo custo. Na presente invenção, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico nanoestruturado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (AuCNT) acoplados quimicamente a anticorpos monoclonais (Anti-ALP) para a detecção eficaz de pequenas às mais altas concentrações de fosfatase alcalina.

As nanopartículas de ouro são bastante utilizadas na biotecnologia e principalmente no desenvolvimento de biossensores, atuando como suporte para biomoléculas, sem alterar as suas propriedades biológicas e como adjuvantes em outros nanomateriais. Os nanotubos de carbono são nanomateriais muito utilizados no desenvolvimento de sensores, devido a sua elevada área específica de ligação e condutividade elétrica, e quando acoplados a nanopartículas de ouro, potencializam o desempenho dos biodispositivos.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima sorológica humana presente em células musculares lisas das artérias e em outros tipos de células. Esta enzima participa do processo de mineralização óssea auxiliando na deposição do fosfato de cálcio no processo de formação dos cristais de hidroxiapatita (ATSUSHI SHIOI, 2012). Alguns estudos demonstram a relação entre o aumento da fosfatase alcalina e o processo de calcificação intravascular, os quais supõem que a inflamação vascular causada por agentes mecânicos ou o aumento do LDL com a formação de placas ateroscleróticas, pode provocar um estímulo a calcificação localizada nos vasos. Esse tipo de calcificação é comum em pacientes portadores de aterosclerose, inflamação vascular e doenças cardíacas (SONOKO NARISAWA, 2007; ATSUSHI SHIOI, 2012). Os níveis séricos de ALP variam normalmente entre 56 e 156 UI/L em adultos entre 13 e 43 UI/L em crianças. Alterações nos níveis séricos dessa enzima podem ser indicadores de diversas patologias como a Doença de Paget, osteomalacia, uremia, doença renal, tumores, doenças hepáticas, processos de calcificações

vasculares em pacientes portadores de doenças cardíacas (HONG-JEONG KIM, 2005; XIAOJING ZHU, 2007; ATSUSHI SHIOI, 2012).

A quantificação da ALP em líquidos biológicos é atualmente realizada por algumas técnicas como espectrofotometria, fluorescência, quimioluminescência, eletroquímica e imunoenaios enzimáticos, porém a padrão ouro é a espectrofotometria (HONG-JEONG KIM, 2005; XIAOJING ZHU, 2007). A identificação da fosfatase alcalina pelo método padrão apresenta algumas limitações, como uso de kits específicos e várias etapas de processamento da amostra até a identificação da enzima, que podem ser suprimidas com a utilização de biossensores nanoestruturados. A tendência do uso da nanotecnologia no desenvolvimento de sensores tem como objetivo principal promover uma maior sensibilidade e estabilidade ao biossensor.

O nanocomplexo formado por AuCNT têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de biossensores (YU SHI, 2009; MEHMET LÜTFI YOLA, 2014). Alguns trabalhos presentes na literatura demonstram a eficiência deste nanomaterial no desempenho de diversos tipos de sensores como os eletroquimioluminescentes, amperométricos e eletroquímicos (BEHZAD HAGHIGHI, 2011; SHIHONG CHEN, 2007).

2. Objetivos da Invenção

O presente invento tem como objetivo desenvolver um biossensor eletroquímico sensível, específico, de baixo custo e pequeno volume de amostra utilizada para auxiliar no diagnóstico de diversas doenças, além de monitorar o processo de calcificação vascular em pacientes portadores de doenças arteriais, através da identificação e quantificação da fosfatase alcalina sorológica humana.

O principal objetivo do imunossensor baseado em AuCNT é promover uma maior sensibilidade na detecção de concentrações de fosfatase alcalina sorológica quando comparada aos testes de quantificação convencionais.

3. Vantagens

O imunossensor apresenta algumas vantagens comparadas aos métodos até então desenvolvidos para a detecção da fosfatase alcalina sorológica, uma das vantagens é o melhor desempenho do sistema apresentado baseado na utilização dos nanomateriais como plataforma estrutural do biossensor. Maior estabilidade se deve a plataforma sensora desenvolvida através do uso dos AuCNT ligados covalentemente a um suporte sólido. Em adição, os anticorpos são fortemente acoplados às nanopartículas de ouro favorecendo o aumento da estabilidade, e um maior

número de ligações de anticorpos a plataforma desenvolvida. Essa nova estratégia provoca uma maior sensibilidade e estabilidade do biossensor.

A ligação específica entre o anticorpo monoclonal e a fosfatase alcalina ocorre através de interações químicas ou físicas, entre elas as pontes de hidrogênio, eletrostática, Van der Waals. A interação da fosfatase alcalina e o anticorpo monoclonal é mensurada por alteração de corrente gerada no invento proposto.

4. A novidade e o efeito técnico alcançado

O imunossensor eletroquímico nanoestruturado capaz de detectar a fosfatase alcalina em amostra sorológica humana e monitorar processos de calcificação vascular, é a novidade proposta. Em adição, a sensibilidade do novo sistema é capaz de superar as técnicas utilizadas atualmente.

O biodispositivo desenvolvido é inovador, pois nenhum outro semelhante foi descrito na literatura para a identificação e quantificação da fosfatase alcalina sorológica.

5. Caracterização do imunossensor para detecção da fosfatase alcalina

O imunossensor eletroquímico desenvolvido foi caracterizado através das técnicas eletroquímicas amperométricas e potenciométricas. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no PGSTAT 128N potentiostato/galvanostatato (Autolab, Netherlands) com três eletrodos e uma célula eletroquímica convencional, sendo um eletrodo de trabalho de ouro, outro auxiliar de platina, e um de referência Ag/AgCl saturado com KCl. Todos os experimentos foram realizados na presença de 10mM de uma solução eletrolítica de ferro-ferricianeto de potássio. A voltametria cíclica (VC) foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7V em uma velocidade de varredura de 50m.Vs⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada a frequência de 100 mHz e 100 kHz com um potencial aplicado de 10mV.

Características do imunossensor para detecção da fosfatase alcalina

Durante todas as etapas de desenvolvimento do imunossensor foram realizadas análises eletroquímicas para avaliar e acompanhar todo o processo de montagem do biossensor.

Na Fig 1 e 2 obtivemos o voltamograma cíclico e o diagrama de Nyquist respectivamente, de toda a caracterização eletroquímica do biossensor. Inicialmente, foi demonstrado o eletrodo

limpo, em seguida a cisteína foi adsorvida, provocando uma diminuição das correntes de picos anódicas e catódicas no voltamograma e um aumento no diâmetro no semicírculo do diagrama de Nyquist, demonstrando a modificação da superfície do eletrodo. Em seguida, com a ligação dos AuCNT ao sistema foi observado um aumento na resistência a transferência de elétrons. Posteriormente, a cisteamina foi adicionada ao sensor, resultando em uma mudança nas correntes de pico e no diagrama de Nyquist promovendo em uma maior condutividade do sistema. Para contribuir com uma maior estabilidade ao sensor, o EDC:NHS foi adicionado, e por ser um agente ativador houve aumento adicional na resistência elétrica do sistema e possibilitando a ligação do anticorpo à plataforma nanoestruturada. Após a ligação do anticorpo foi adicionado o BSA que provocou uma discreta diminuição das correntes de pico e um aumento no semi-círculo do diagrama de Nyquist, demonstrando que ocorreu a inativação dos sítios ativos remanescentes.

Na Fig 3 e 4 representa o voltamograma cíclico e o diagrama de Nyquist respectivamente, na detecção da fosfatase alcalina sintética. Foi possível detectar a enzima sorológica humana em uma escala de concentração de varia de 0.5 a 600 UI/L. Obtivemos uma diminuição gradativa das correntes de picos e um aumento gradativo no semicírculo do diagrama de Nyquist com o aumento da concentração da fosfatase alcalina. Obtivemos resultados semelhantes nas análises de fosfatase alcalina em amostras reais (figura 5 e 6). Esses resultados demonstram que o sensor desenvolvido apresenta sensibilidade para a fosfatase alcalina, além de apresentar uma boa escala de detecção, tendo em vista que os testes convencionais só apresentam linearidade até a concentração de 400 a 500 UI/L.

Na figura 7 e 8 demonstra o teste de seletividade. Observamos que o invento apresentado não demonstrou resposta significativa a outro marcador sorológico que geralmente se apresenta aumentando juntamente com fosfatase alcalina. A elevada concentração de proteína C reativa (PCR) não provocou mudança relevante nos padrões eletroquímicos do imunossensor. Podemos concluir que o invento apresentado demonstrou ser um dispositivo nanoestruturado inovador para a detecção sensível e específica da fosfatase alcalina sorológica humana.

40. Bibliografia

41. ATSUSHI SHIOI, M. K. Y. O. K. M. S. J. Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human. **Circulation Research**, Osaka, v. 91, n. 1, p. 9-16, July 2012.

42. SONOKO NARISAWA, D. H. M. C. Y. W. O. M. F. H. J. L. M. Novel Inhibitors of Alkaline Phosphatase Suppress Vascular Smooth. **Journal of Bone and mineral Research**, California, v. 22, n. 11, p. 1700-1710, July 2007.
43. HONG-JEONG KIM, J. K. Electrochemical determination of total alkaline phosphatase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577 , p. 243–248, 2005.
44. XIAOJING ZHU, C. J. 8-Quinolyl phosphate as a substrate for the fluorimetric. **Clinica Chimica Acta** , v. 377 , p. 150–153, 2007.
45. YU SHI, R. Y. P. K. Y. Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold. **Carbon**, v. 47, p. 1146-1151, 2009.
46. MEHMET LÜTFİ YOLA, N. A. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in. **Electrochimica Acta** , v. 119, p. 24– 31, 2014.
47. BEHZAD HAGHIGHI, S. B. L. G. Fabrication of a novel electrochemiluminescence glucose biosensor using. **Sensors and Actuators B** , v. 155, p. 577–583, 2011.
48. SHIHONG CHEN, R. Y. Y. C. L. Z. N. W. X. L. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22 , p. 1268–1274, 2007.

FIGURAS

Figura 1

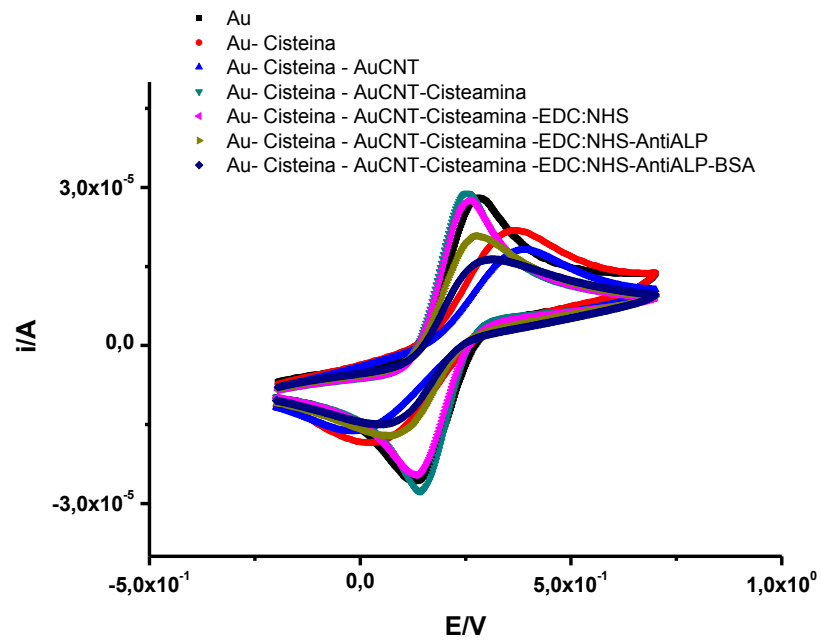


Figura 2

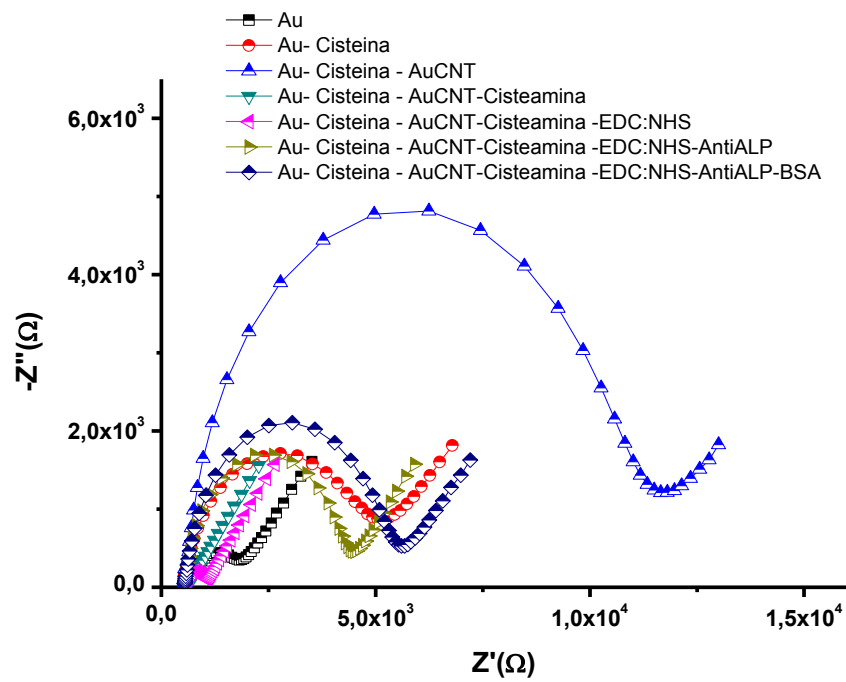


Figura 3

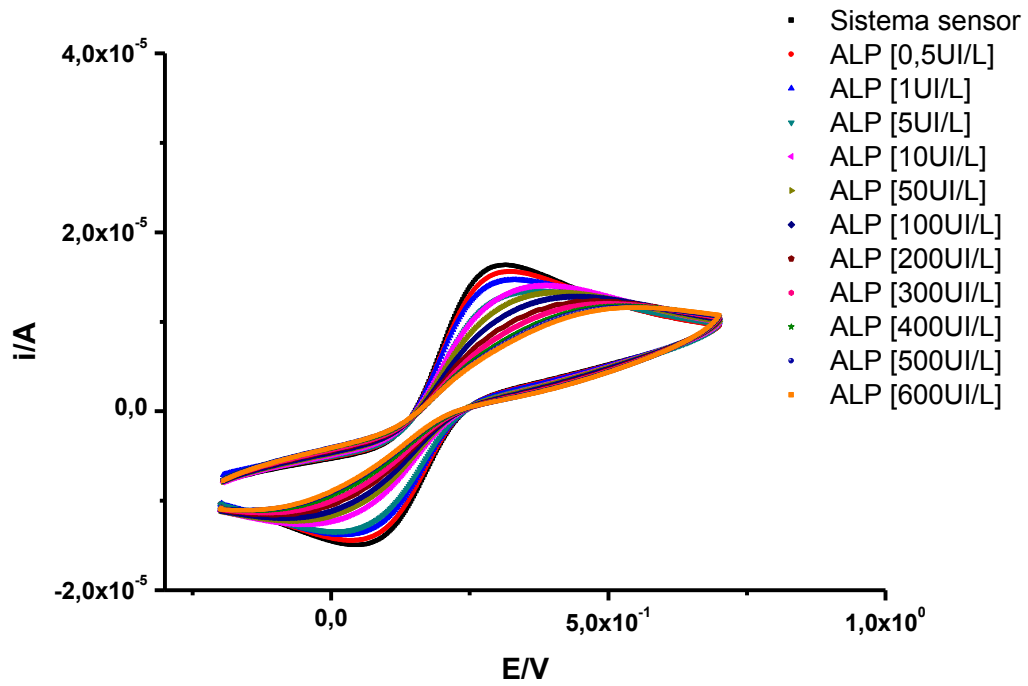


Figura 4

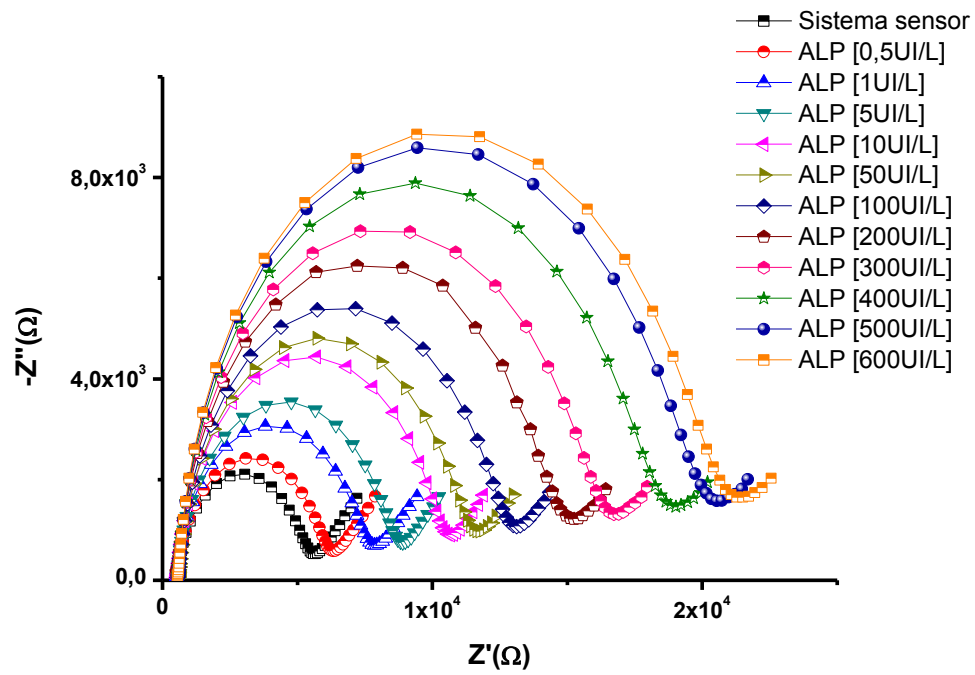


Figura 5

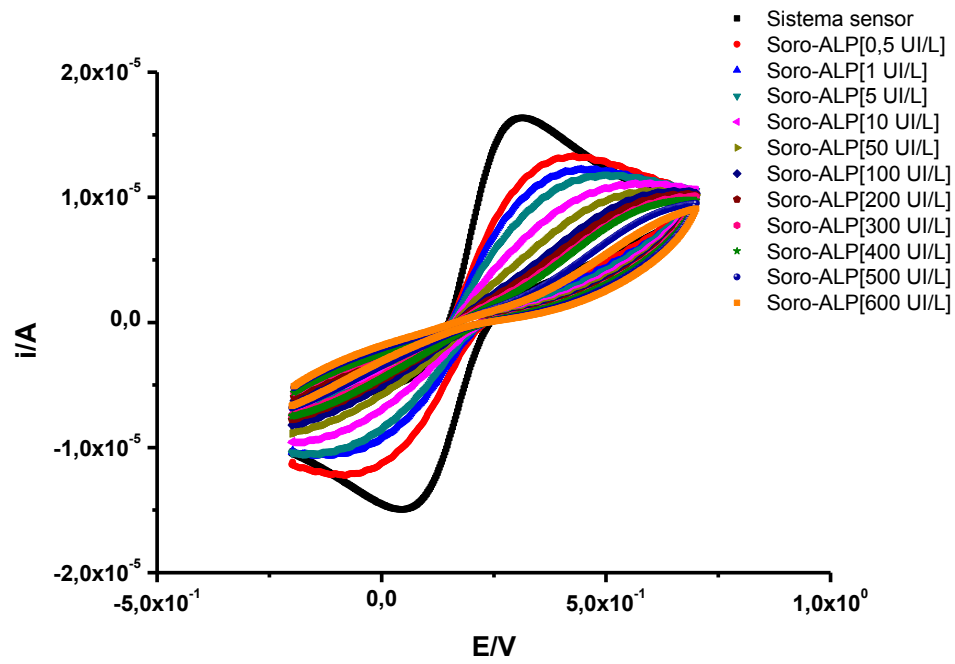


Figura 6

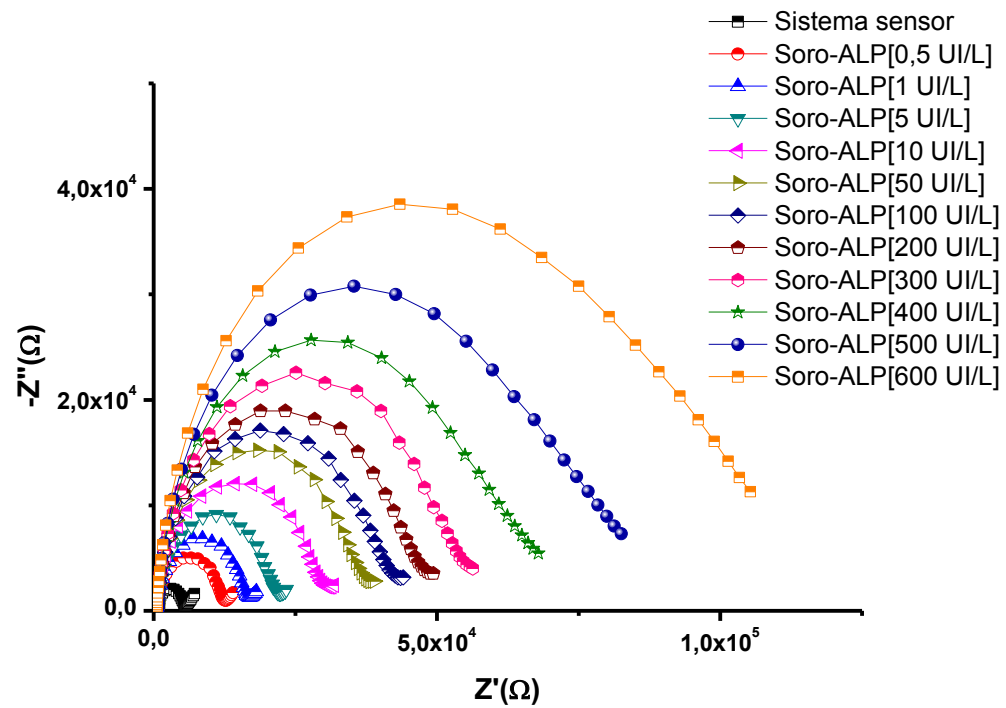


Figura 7

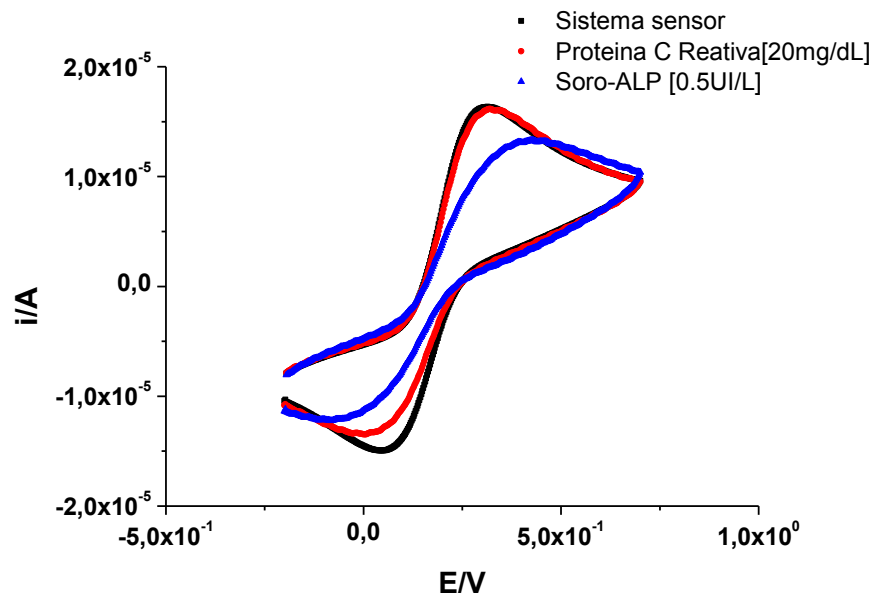
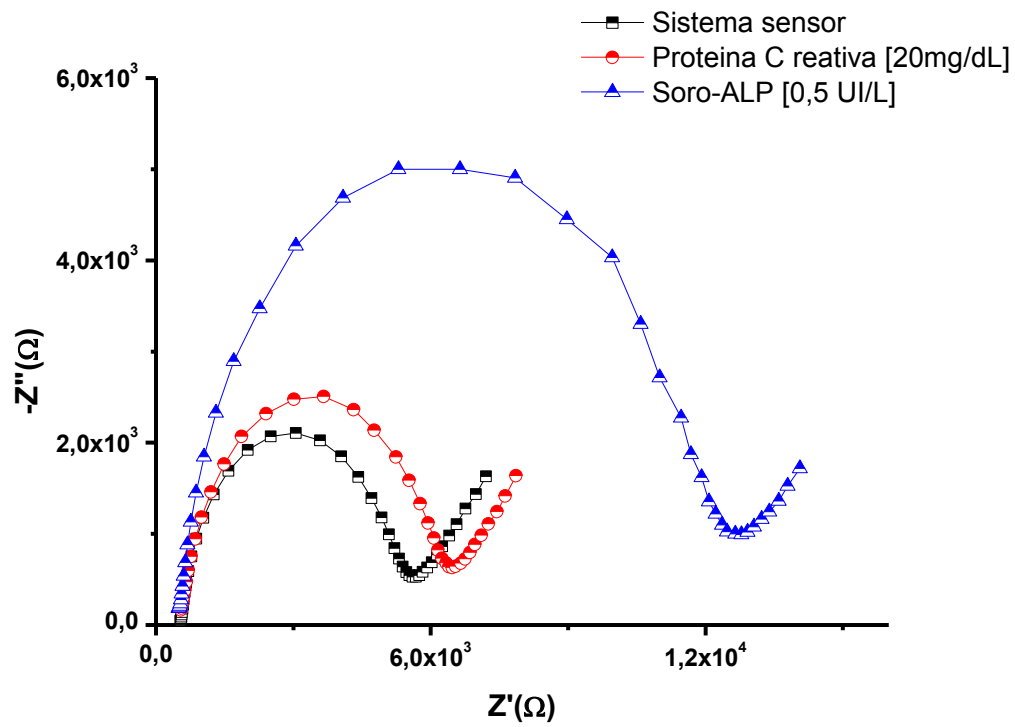


Figura 8



6 ARTIGO

ARTIGO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*

**SIMPLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD
NANOPARTICLES AND CARBON NANOTUBES FOR DETECTION OF
SOROLOGICAL ALKALINE PHOSPHATASE**

Estefani P. Simão¹, Isaac A. M. Frías², Cesar A.S. Andrade^{2,3}, Maria D.L. Oliveira^{1,2,3}

SIMPLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES
AND CARBON NANOTUBES FOR DETECTION OF SOROLOGICAL ALKALINE
PHOSPHATASE

Estefani P. Simão¹, Isaac A. M. Frías², Cesar A.S. Andrade^{2,3}, Maria D.L. Oliveira^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE,
Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil. Phone:
+55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

Alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme that serologic levels plays an important role in calcification processes in the human body. It is used clinically as an indicator of certain diseases such as osteomalacia, Paget's disease, arterial tumors and calcifications. In this study it was possible to develop a impedimetric immunosensor for alkaline phosphatase. The immunosensor was obtained by adsorption of cysteine (Cys) on the working electrode surface after the immobilization of carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles modified with cysteamine (CistAuCNT) via 1- [3- (dimethylamino) propyl] -3- ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) used as activators elements. Then the anti-alkaline phosphatase antibody (antiALP) was immobilized to obtained the Cys-CistAuCNT-AntiALP sensor. To characterize each development stage of the immunosensor and evaluation of their specific recognition were used cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques. In addition, the atomic force microscopy (AFM) allowed the morphological analysis of the system. The interaction of the immunosensor with different ALP concentrations resulted in changes in peak values of the currents (anodic and cathodic) and charge transfer resistance (R_{ct}), indicating the process of biorecognition with the antigen. The immunosensor showed high sensitivity, selectivity and a detection range of 0.5 to 600 IU.L⁻¹ ALP. The biosensor was designed capable of detecting a wide range of ALP concentrations exceeding the conventional analytical methods for determination of this enzyme. The immunosensor developed showed good sensitivity and specificity for the determination of ALP.

Keywords: Electrochemistry. Immunosensor. Alkaline phosphatase. Carbon nanotubes.

Introduction

Serological enzymes are important signaling of changes in the human body such as metabolic disorders, diseases, calcification processes. Alkaline phosphatase (ALP) is of great importance for the predictive diagnosis of various diseases such as osteomalacia, Paget's disease, tumors, thyroid disorders, liver diseases, biliary obstructions and calcification processes in blood vessels of patients with heart disease [1–5]. ALP is one of the phenotypic markers of osteoblasts and is therefore considered essential in the bone mineralization process [6]. This enzyme is present in smooth muscle cells of the arteries, actively participating in the calcification of blood vessels in cases of coronary artery disease [7,8].

Serum levels of ALP usually varies between 56 and 156 IU / L in adults and 13 and 43 IU / L in children. The quantification of this enzyme is extremely important for the diagnosis of several pathologies. Some research associated ALP as an indicator of the presence of vascular calcification mainly in patients who are affected by coronary artery disease [9]. Given the importance of the dosage of this enzyme, quantification methods were developed in order to monitor the levels of alkaline phosphatase [8,10].

Some methods are used for identification and quantification of human alkaline phosphatase, such as spectrophotometry, fluorescence, chemiluminescence, electrochemistry, enzyme immunoassays and spectrophotometry [3,4]. These methods have some disadvantages such as steps of sample processing that increase the time and cost of analysis. Therefore, given the disadvantages of the traditional methods, the use of new technologies as electrochemical bioassays, is useful to reduce and shorten the ALP detection analysis.

In addition, electrochemical biodevices are low cost, easy to operate and involves low time consume bioanalytical response when enzymes, antigens, antibodies, nucleic acids, among others, are immobilized together with a transducer.

Among electrochemical devices the immunosensors are platforms used to detect proteins, biomarkers, biological toxins, food analysis, environment and clinical diagnosis [11–13].

The electrochemical detection of ALP compared to traditional methods of analysis presents some advantages such as the detection capacity of the enzyme in low concentrations [14,15]. Thus, an ideal detection system should involve simple instruments and that couple the use of biomolecules means of electronic systems (voltammetric and / or impedimetric) for the development of portable and disposable biosensors [16,17].

Nanomaterials are a useful tool in the development of electrochemical biosensors due the excellent physical-chemistry properties [18]. In addition, the association between nanostructures and biomolecules to biosensitive systems is of great interest in biotechnology and bioanalytical chemistry. Metallic nanoparticles such as gold nanoparticles (AuNps) associated with another nanostructure such as carbon nanotubes (CNT) can improve the performance of biosensors by increased surface area and excellent biocompatibility [12,18,19].

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) have been widely applied in bioelectrochemistry for the biodevices development and in study of electrode kinetics and double electrical layer properties study [20]. Furthermore, these techniques can be applied to obtain information regarding the interaction between the antibody and the antigen of interest [21].

The present study presents a new proposal for the sensitive detection of human serological alkaline phosphatase using an electrochemical immunosensor based on an adsorption of cysteine (Cys) on the working electrode surface after the immobilization of carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles modified with cysteamine (AuCNT-cysteamine) via 1- [3- (dimethylamino) propyl] -3- ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) used as activators elements for after the anti-alkaline phosphatase antibody (AntiALP) was immobilized to obtained the Cys-AuCNT-cysteamine- AntiALP sensor. The aim of this work was to provide a label free and highly sensible monitoring biosensor that could help to identify altered levels of ALP in diverser syndroms like coronary artery disease.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Alkaline phosphatase (ALP), antibodies to alkaline phosphatase (AntiALP), carbon nanotubes (CNT), ferrocyanide/ferricyanide redox couple ($K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$), bovine serum albumin (BSA), cysteine, cysteamine, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma Chemical. All chemicals and analytical grade solvents were used as received without further purification.

2.2 Synthesis of AuNPs and AuCNT

Initially, trisodium citrate (0.5mL) was used to reduce 0.01 M $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (1:1) and the solution was completed with deionized water 18.4 mL. This mixture was prepared under refrigeration. Thereafter, a stirred mixture of 0.1 M $NaBH_4$ was added. After stirring the mixture, a change in coloration to a pink color is observed indicating a formation of gold nanoparticles [22].

AuNP/CNT system was obtained with mixture of 9.3 mg of CNT and 10 mL of AuNP previously synthesized. After mixing the nanomaterials, 6 mL of ethanol was added to the mixture under vigorous stirring for 10 minutes. The addition of ethanol was able to reduce the surface tension between the carbon nanotubes and the water favoring the physical adsorption of the gold nanoparticles to the carbon nanotubes. The mixture was stirred for 10 hours and then subjected to 5 washing cycles with deionized water and centrifuged at 10,000 rpm. Furthermore, the obtained sample dried at 70 °C [22].

2.4 Preparation of the Immunosensor

The gold electrode was polished in alumina, rinsed in deionized water and dried at room temperature. Subsequently, 5 μ L of cysteine (70 mM) was immobilized on the electrode surface for

10 minutes. After, AuCNT (5 μ L) were physically adsorbed to the surface of the Cys-modified electrode for 30 minutes. After adsorption of the nanocomplex, 70mM of cysteamine was added to the system, which was able to modify by chemical adsorption of the gold nanoparticles for subsequent binding of the antibodies. To activate the cysteamine carboxylic groups and to promote binding of the antibody to the biosensor, 2mM of 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 5mM N-hydroxysuccinimide (NHS) were added in a ratio of 1:1 in acetate buffer (pH 5.0) for 2 hours. After activation it was possible to add 225 μ g.mL⁻¹ of monoclonal antibodies (AntiALP) to the sensor system and incubated for 10 minutes. Subsequently, the addition of bovine serum albumin (BSA) was necessary to block remaining sites still active.

2.5 Process of biointeraction

The sensor was exposed to various concentrations of human and synthetic ALP. The concentrations analyzed ranged from 0.5 to 600 IU.L⁻¹. Studies of ALP concentrations were based on the need to develop a biosensor capable of exceeding the detection limits of conventional techniques used for enzyme dosages in human serum samples, dispensing dilution of samples with concentrations above 400 IU.L⁻¹. All samples used in this study were dosed by the spectrophotometric method before being dosed by the developed immunosensor.

2.6 Specificity analysis

C-reactive serological protein (CRP) is an inflammatory marker such as ALP that is found to be quite elevated in patients suffering from cardiovascular diseases, tumors, rheumatic diseases,

bacterial infections. In addition, developed immunosensor was exposed to the CRP sample at 20mg.dL^{-1} to evaluate the specificity of the immunosensor.

2.7 Electrochemical measures

All electrochemical measurements were performed on the PGSTAT 128N potentiostat / galvanostato (Autolab, The Netherlands) with three electrodes and a conventional electrochemical cell containing a platinum wire electrode as auxiliary electrode, Ag/AgCl electrode saturated with a KCl solution as the electrode reference, and a gold disc as working electrode (2mm). All experiments were performed in the presence of 10mM of redox pair $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [1:1]. The Nyquist data were obtained in a frequency range between 100 mHz and 100 kHz with an applied potential of 10 mV. The CV was performed at a potential between -0.2 and +0.7 V and scan rate of 50mVs^{-1} .

2.8 Atomic Force Microscopy

AFM analysis of the system were performed through an atomic force microscope (SPM-9700, Shimadzu Corporation, Japan) in a noncontact mode in air at room temperature [23]. Cantilevers with a silicon AFM probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 N.m^{-1}) were used. The images (512 points per line) were collected with a scan rate of 1.0 Hz in a scan area of $5.0 \times 5.0\text{ }\mu\text{m}$. Furthermore, images were collected and analyzed using AFM Gwyddion software [24].

3. Results and discussion

3.1 Morphological characterization of immunosensor

Atomic force microscopy was used to evaluate the modification process of the immunosensor obtained and investigate the changes of the surface morphology of the sensor system before and after antibody-antigen complex formation. After the adsorption of the Cys molecules, the smooth surface morphology was modified (Fig. 2a). It was observed the complete and homogeneous layer with Cys height about 37 nm. In addition, Cys surface has not revealed presence of aggregates or blemish. After obtaining the Cys-AuCNT-Cysteamine system, it is noted an increase in the surface rugosity (Figure 2b). Cys- AuCNT -Cysteamine system showed a surface rugosity of 63 ± 3 nm. After anti-ALP immobilization was obtained the Cys-AuCNT-Cysteamine-AntiALP sensor system (Figure 2c) with roughness of $75 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. As decribed in previous work we found a typical height for antibody layer ranging from 6 to 12 nm [25–27] . Additionally, the specific interaction with ALP sample resulted in good coverage and change in the morphology indicating that the ALP was successfully recognized on the sensor surface (Fig. 2d). On the other hand, Fig. 2e shows the morphology for a non-specific antigen where there were no significant changes on the sensor surface when compared with the image of the antibody-antigen complex.

3.2 Electrochemical characterization

Figure 3a shows the cyclic voltammograms of the immunosensor assembly process. The cleaned gold electrode presents well-defined peak currents demonstrating the oxidation and reduction process of the redox probe related with the diffusion limited process. After cysteine adsorption was observed a decrease in the amperometric current caused by the repulsion of potassium ferro-ferricyanide due to the negative characteristic of the cysteine. This process have demonstrated the interaction of this molecule with the gold electrode surface through the thiol group (SH) [25,28].

The AuCNTs were physically adsorbed to the cysteine, causing a new decrease in the peak currents and a blockage of the electron transfer (Figure 3a). In addition, after adsorption of

cysteamine was verified an increase in the amperometric currents due to the positive charge of this molecule. This adsorption provokes the attraction of the redox probe which is negatively charged at pH 7.4 [29]. Furthermore, the EDC: NHS is coupled to the modified system to activate the cysteamine carboxyl groups favoring the covalent binding with the amine groups present in the AntiALP, causing a decrease in the electron transfer resistance of the system [30] (Fig 3a). To avoiding non-specific interactions, BSA was added to the sensor system [31].

Figure 3b shows the impedimetric characteristics of the electrode modifications. Impedance data reveals a semicircle portion observed at high frequencies. This part corresponds to the electron transfer limited process and its diameter is equal to the electron transfer resistance (R_{ct}), which reflects the electron transfer of the redox pair at the electrode interface. EIE analysis of gold electrode showed a lower charge transfer resistance ($R_{ct} = 579 \Omega$) when compared with others steps (Table 1). Cysteine adsorption revealed an increase in the impedimetric response ($R_{ct} = 4.40 \text{ k}\Omega$), demonstrating the formation of the Cys monolayer at sensing surface. The Cys molecules obstructed the charge transfer of the electrochemical probe and contributed to the increase in the semicircle diameter. AuNP-Cys adsorption provoked an increase in the R_{ct} ($10.2 \text{ k}\Omega$) due the blockage of the electron transfer.

The addition of cysteamine to the sensor system causes a decrease in the impedimetric response ($R_{ct} = 0.237 \text{ k}\Omega$), which may be ascribed to the attraction between the positive charge of amino group in cysteamine and negative charge of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, leading to the accumulation of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ on the electrode surface [29]. After being modified with the Cys- AuCNT- cysteamine -AntiALP system, the EIS of this modified electrode shows a higher interfacial charge transfer resistance ($R_{ct} = 3.77 \text{ k}\Omega$). When BSA was added in electrochemical surface, R_{ct} increased again, which indicated the formation of the sensor layer and the subsequent this introduction hindering the electron transfer.

3.2 Electrochemical detection of ALP

The biorecognition process of the Cys-AuCNT-cysteamine-AntiALP system, was observed by the EIS technique. An increase in the impedimetric response was observed after interaction between antiALP and ALP. It can be observed that, the gradual increment in diameter of Nyquist semicircle was related to the synthetic and serological enzyme concentrations (Fig. 4a e b). This behavior revealed the formation of an immunocomplex resulting from the binding of the antibody to the specific antigen [32].

The good efficiency of the immunosensor was proved by means of theoretical calculations obtained from the electrochemical experimental results. By using the EIS technique it is possible to extract analytical results for the data obtained through the Randles circuit (insert Fig. 3b), where it is possible to extract the R_{ct} (Table 1) and $\Delta R_{ct}\%$ according to the equation below:

$$\Delta R_{ct}\% = \frac{R_{ct(\text{immunosensor} + \text{ALP})} - R_{ct(\text{immunosensor})}}{R_{ct(\text{immunosensor})}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Where $R_{ct(\text{immunosensor} + \text{ALP})}$ is the value of the charge transfer resistance of the immunosensor recognition, after the interaction of the immunosensor with the ALP and $R_{ct(\text{immunosensor})}$ is corresponding to the resistance value of charge transfer of the sensor system before interaction with ALP. The $\Delta R_{ct}\%$ reflects the affinity of the immunosensor to ALP, varying the values after exposure of enzyme concentrations.

Fig. 5 shows a linear increase of $\Delta R_{ct}\%$ as function of synthetic and serological ALP concentrations (5.0 to 600 IU.L⁻¹), confirming the identification of ALP by the immunosensor, showing a good linearity in the range of clinical importance.

The R_{ct} values can inform the surface coating of the immunosensor by means of the theoretical calculation of θ :

$$\theta = 1 - \left(\frac{R_{ct}(\text{Sensor system})}{R_{ct}(\text{ALP})} \right) \quad (\text{Eq.2})$$

The degree of surface coating (θ) is based on the ratio between the R_{ct} of the sensor system (Cys-AuCNT-cysteamine-AntiALP) and R_{ct} the detection of different ALP concentrations. The θ of the immunosensor in the ALP is directly proportional to the increase in the concentration of the detected enzyme. Fig. 6 shows a plot of θ as a function of concentration of ALP bound to the sensor. The value of θ increases with increasing ALP concentration and is found to be ~ 0.75 (75%) to synthetic sample (Fig. 6a) and ~ 0.95 (95%) to ALP (Fig. 6b) from serum at 600 IU.L^{-1} .

It is important to highlight that the biosensors presented in the literature for the detection of ALP non-show detection range as exposed in the present work, which stands out for presenting a larger range than the conventional tests, dispensing preanalytical preparations or step of dilutions for analysis of the clinical sample (Table 2). In addition, the use of nanostructures in electrochemical techniques are important in the development of biosensors, by increasing of the surface area for the molecules immobilization providing a higher performance of the sensor, as demonstrated in the present work.

3.3 Immunosensor selectivity

The selectivity of the immunosensor was evaluated with another marker that is important in some inflammatory processes such as ALP. C-reactive protein is a protein that the plasmatic levels

are elevated in patients with disorders that triggers inflammation. It is a protein that is usually synergistic to serological ALP [33,34]. In view of the relationship of these two proteins, we exposed the sensor to a concentration of CRP at 20 mg. dL⁻¹.

It was observed an insignificant increase in charge transfer resistance when the biosystem was evaluated to CRP (Table 1). This behavior showed that there is no interaction between sensor platform and CRP, proving specificity of the developed immunosensor. In addition, this response reflects the biospecificity of the immunosensor to ALP, verified with electrochemical response with synthetic and serological ALP. As mentioned previously this process of biointeraction is due to the attraction between antigen and specific antibody guided by electrostatic interactions or hydrogen bonds, which, despite being weak bonds, reflect the specificity of immunoreaction [35].

4. Conclusions

A nanostructured platform developed in this work is innovative and simple to be applied to ALP evaluation. CV and EIS were applied to evaluate the detection of ALP in the presence of the K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ redox probe. In addition, electrochemical CV and EIS revealed be useful for monitoring each stage of sensor development. We were able to observe that antiALP retained its biological activities after contact with the electrode surface. The developed immunoassay showed a good sensitivity to alkaline phosphatase and was able to detect small concentrations of the serological enzyme. The present results are an important basis for the development of sensitive ALP sensor and a useful strategy for atherosclerosis diagnosis and others inflammatory process using clinical samples.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9), MCT/FINEP,

PROPESQ/UFPE and FACEPE-PPSUS-APQ-0040-4.00/13. Pontes would like to thank Capes for MSc scholarship.

5. REFERENCES

- [1] R.E. Gyurcsányi, A. Bereczki, G. Nagy, M.R. Neuman, E. Lindner, Amperometric microcells for alkaline phosphatase assay., *The Analyst*. 127 (2002) 235–240. doi:10.1039/b105308f.
- [2] C.M. Li, S.J. Zhen, J. Wang, Y.F. Li, C.Z. Huang, A gold nanoparticles-based colorimetric assay for alkaline phosphatase detection with tunable dynamic range, *Biosensors and Bioelectronics*. 43 (2013) 366–371. doi:10.1016/j.bios.2012.12.015.
- [3] H.J. Kim, J. Kwak, Electrochemical determination of total alkaline phosphatase in human blood with a micropatterned ITO film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 577 (2005) 243–248. doi:10.1016/j.jelechem.2004.11.035.
- [4] X. Zhu, C. Jiang, 8-Quinolyl phosphate as a substrate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase, *Clinica Chimica Acta*. 377 (2007) 150–153. doi:10.1016/j.cca.2006.09.015.
- [5] a. Shioi, Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Roles of Tumor Necrosis Factor-alpha and Oncostatin M Derived From Macrophages, *Circulation Research*. 91 (2002) 9–16. doi:10.1161/01.RES.0000026421.61398.F2.
- [6] M. Schoppet, C.M. Shanahan, Role for alkaline phosphatase as an inducer of vascular calcification in renal failure?, *Kidney International*. 73 (2008) 989–991. doi:10.1038/ki.2008.104.
- [7] S. Narisawa, D. Harmey, M.C. Yadav, W.C. O'Neill, M.F. Hoylaerts, J.L. Millán, Novel

inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification., *Journal of Bone and Mineral Research*. 22 (2007) 1700–1710. doi:10.1359/jbmr.070714.

- [8] M. Liberman, A.E. Pereira Pesaro, L.S. Carmo, C. Vicente, S. Jr, Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications *Calcificação vascular: fisiopatologia e implicações clínicas*, Einstein. 11 (2013) 376–82.
- [9] H. Li, J. He, S. Li, A.P.F. Turner, Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3, *Biosensors and Bioelectronics*. 43 (2013) 25–29. doi:10.1016/j.bios.2012.11.037.
- [10] L.M. Lima, M.D.G. Carvalho, A.A. Loures-Vale, C.P. Da Fonseca Neto, J.C.D.F. Garcia, J.A. Saad, M.O. Sousa, Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia, *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*. 43 (2007) 83–86. doi:10.1590/S1676-24442007000200003.
- [11] Y. Tan, X. Chu, G.L. Shen, R.Q. Yu, A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice, *Analytical Biochemistry*. 387 (2009) 82–86. doi:10.1016/j.ab.2008.12.030.
- [12] N.J. Ronkainen, S.L. Okon, Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers, *Materials*. 7 (2014) 4669–4709. doi:10.3390/ma7064669.
- [13] T. Bryan, X. Luo, P.R. Bueno, J.J. Davis, An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood, *Biosensors and Bioelectronics*. 39 (2013) 94–98. doi:10.1016/j.bios.2012.06.051.
- [14] J.H. Wang, K. Wang, B. Bartling, C.C. Liu, The detection of alkaline phosphatase using an electrochemical biosensor in a single-step approach, *Sensors*. 9 (2009) 8709–8721. doi:10.3390/s91108709.

- [15] A.L. Alvarado-Gómez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination., *Sensors* (Basel, Switzerland). 14 (2014) 3756–3767. doi:10.3390/s140203756.
- [16] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, S. Yao, Recent advances in electrochemical glucose biosensors, *RSC Advances*. 3 (2013) 4473–4491. doi:10.1039/c2ra22351a.
- [17] D. Jiang, J. Ji, lu an, X. Sun, Y. Zhang, G. Zhang, L. Tang, Mast cell-based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin), *Biosensors and Bioelectronics*. 50 (2013) 150–156. doi:10.1016/j.bios.2013.06.032.
- [18] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, *Analytica Chimica Acta*. 887 (2015) 17–37. doi:10.1016/j.aca.2015.05.049.
- [19] S.A. Lim, M.U. Ahmed, Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review, *RSC Adv*. 6 (2016) 24995–25014. doi:10.1039/C6RA00333H.
- [20] J. V. Rushworth, A. Ahmed, H.H. Griffiths, N.M. Pollock, N.M. Hooper, P.A. Millner, A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers, *Biosensors and Bioelectronics*. 56 (2014) 83–90. doi:10.1016/j.bios.2013.12.036.
- [21] R.K. Gupta, R. Pandya, T. Sieffert, M. Meyyappan, J.E. Koehne, Multiplexed electrochemical immunosensor for label-free detection of cardiac markers using a carbon nanofiber array chip, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 773 (2016) 53–62. doi:10.1016/j.jelechem.2016.04.034.

- [22] Y. Shi, R. Yang, P.K. Yuet, Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst, *Carbon*. 47 (2009) 1146–1151. doi:10.1016/j.carbon.2008.12.049.
- [23] G.S. Santos, C.A.S. Andrade, I.S. Bruscky, L.B. Wanderley, F.L. Melo, M.D.L. Oliveira, Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 137 (2017) 163–169. doi:10.1016/j.jpba.2017.01.031.
- [24] A. Sikora, A. Rodak, O. Unold, P. Klapetek, The development of the spatially correlated adjustment wavelet filter for atomic force microscopy data, *Ultramicroscopy*. 171 (2016) 146–152. doi:10.1016/j.ultramic.2016.09.012.
- [25] E.P. Simão, G.J.L.S. Barbieri, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 27 (2016) 1040–1047. doi:10.5935/0103-5053.20150361.
- [26] C. Hao, F. Yan, L. Ding, Y. Xue, H. Ju, A self-assembled monolayer based electrochemical immunosensor for detection of leukemia K562A cells, *Electrochemistry Communications*. 9 (2007) 1359–1364. doi:10.1016/j.elecom.2007.01.047.
- [27] L. Yang, Y. Li, AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7, *Biosensors and Bioelectronics*. 20 (2005) 1407–1416. doi:10.1016/j.bios.2004.06.024.
- [28] D.M.N. Luna, K.Y.P.S. Avelino, M.T. Cordeiro, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 220 (2015) 565–572. doi:10.1016/j.snb.2015.05.067.

- [29] F. Arduini, S. Guidone, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone, Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 179 (2013) 201–208. doi:10.1016/j.snb.2012.10.016.
- [30] S. Dulay, P. Lozano-Sánchez, E. Iwuoha, I. Katakis, C.K. O’Sullivan, Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry, *Biosensors and Bioelectronics*. 26 (2011) 3852–3856. doi:10.1016/j.bios.2011.02.045.
- [31] A. Sharma, Z. Matharu, G. Sumana, P.R. Solanki, C.G. Kim, B.D. Malhotra, Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection, in: *Thin Solid Films*, 2010: pp. 1213–1218. doi:10.1016/j.tsf.2010.08.071.
- [32] V. Serafín, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 195 (2014) 494–499. doi:10.1016/j.snb.2014.01.055.
- [33] M.I. Pearce, A. Cuthbert, G. Porter, P.R.J. Ames, Improvement of chronic osteomyelitis after granulocyte colony stimulating factor, *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 29 (2013) 48–51. doi:10.1007/s12288-011-0127-6.
- [34] C. Karakaya, T. Noyan, S. Ekin, E. Babayev, Serum IL-6 and CRP levels in patients with trauma involving low-extremity bone fractures, 18 (2013) 2013.
- [35] R. Seenivasan, N. Maddodi, V. Setaluri, S. Gunasekaran, An electrochemical immunosensing method for detecting melanoma cells, *Biosensors and Bioelectronics*. 68 (2015) 508–515. doi:10.1016/j.bios.2015.01.022.

Table Captions

Table 1. Values referring to the analysis of the equivalent circuit of the immunosensor assembly and interaction of the immunosensor with an ALP extracted from the impedance.

Table 2. Analytical comparison of the immunosensor developed to other biosensors for quantification of ALP.

Figure Captions

Figure 1. Schematic representation of the immunosensor based on gold nanoparticles and carbon nanotubes demonstrating the biosensor assembly steps.

Figure 2. 3D AFM images showing immunosensor assembly steps: a) cysteine monolayer, b) cysteine-AuCNT-cysteamine, c) cysteine-AuCNT-cysteamine-AntiALP d) sensor system-ALP, e) sensor system-negative control.

Figure 3. Cyclic Voltammogram **(a)**; Nyquist plots **(b)** of each step of the immunosensor assembly: (–)Au; (–)Au-Cys; (–)Au-Cys-AuCNT; (–)Au-Cys- AuCNT-Cysteamine; (–)Au-Cys-AuCNT-Cysteamine-EDC:NHS; (–)Au-Cys - AuCNT-Cysteamine-EDC:NHS-AntiALP; (–) Au-Cys-AuCNT-Cysteamine-EDC:NHS-AntiALP-BSA.

Figure 4. (a) Nyquist plots of synthetic interaction of alkaline phosphatase; **(b)** Nyquist plots of the serological alkaline phosphatase interaction with the immunosensor: (■) Sensor system; (●) 0,5 IU.L⁻¹; (▲) 1 IU.L⁻¹; (▲) 5 IU.L⁻¹; (◆) 10 IU.L⁻¹; (▲) 50 IU.L⁻¹; (▲) 100 IU.L⁻¹; (●) 200 IU.L⁻¹; (*) 300 IU.L⁻¹; (●) 400 IU.L⁻¹; (●) 500 IU.L⁻¹; (*) 600 IU.L⁻¹.

Figure 5. Relative charge transfer ($\Delta R_{ct}\%$) of immunosensor versus concentrations of synthetic ALP **(a)** and serological **(b)** at different concentrations of ALP (0.5-600 IU.L⁻¹).

Figure 6. Surface of coverage of the immunosensor versus the concentrations of synthetic ALP **(a)** and serological **(b)** at different cocentrations of ALP.

Table 1

Modified eletrode	R_{ct} (kΩ)	Q^{a*} (μF)	n^{b*}
Au	0.57	11.3	0.647
Cysteine (Cys)	4.40	3.08	0.822
Cys – AuCNT	10.2	9.32	0.941
Cys- AuCNT- cysteamine	0.23	4.78	0.397
Cys - AuCNT- cysteamine -EDC:NHS	0.47	1.27	0.856
Cys - AuCNT- cysteamine -AntiALP	3.77	7.46	0.912
Cys - AuCNT- cysteamine-AntiALP-BSA	4.83	6.53	0.908
Biosystem-ALP [0.5 IU.L ⁻¹]	5.52	6.35	0.911
Biosystem-ALP [1 IU.L ⁻¹]	7.00	6.29	0.914
Biosystem-ALP [5 IU.L ⁻¹]	7.98	6.10	0.917
Biosystem-ALP [10 IU.L ⁻¹]	9.72	6.16	0.928
Biosystem-ALP [50 IU.L ⁻¹]	10.60	6.31	0.926
Biosystem-ALP [100 IU.L ⁻¹]	12.00	6.27	0.926
Biosystem-ALP [200 IU.L ⁻¹]	14.10	6.62	0.916
Biosystem-ALP [300 IU.L ⁻¹]	15.55	6.25	0.926
Biosystem-ALP [400 IU.L ⁻¹]	17.50	6.05	0.931
Biosystem-ALP [500 IU.L ⁻¹]	19.10	6.04	0.931
Biosystem-ALP [600 IU.L ⁻¹]	19.80	6.06	0.930

Biosystem-Serum [0.5 IU.L ⁻¹]	11.70	6.02	0.901
Biosystem-Serum [1 IU.L ⁻¹]	15.80	5.61	0.909
Biosystem-Serum [5 IU.L ⁻¹]	20.80	5.71	0.906
Biosystem-Serum [10 IU.L ⁻¹]	28.70	5.88	0.9
Biosystem-Serum [50 IU.L ⁻¹]	35.50	5.60	0.906
Biosystem-Serum [100 IU.L ⁻¹]	40.00	5.57	0.905
Biosystem-Serum [200 IU.L ⁻¹]	45.00	5.55	0.905
Biosystem-Serum [300 IU.L ⁻¹]	51.80	5.37	0.908
Biosystem-Serum [400 IU.L ⁻¹]	58.80	5.54	0.904
Biosystem-Serum [500 IU.L ⁻¹]	70.40	5.68	0.927
Biosystem-Serum [600 IU.L ⁻¹]	88.50	5.90	0.926
Biosystem-Negative control	5.71	9.53	0.891

^{a*}Constant-phase elemento; ^{b*}Indicates dispersion of relaxation time due to lack of surface homogeneity.

Table 2

Technique	Transducer	Range of Detection	References
Eletrochemical	Indium tin oxide (ITO) film on glass and p-nitrophenyl phosphate	5-180 UI/L	[3]
Fluorimetric	8-Quinolyl phosphate	1.0–16.0 UI/L	[4]
Colorimetric	Conjugated gold nanoparticle/adenosine triphosphate		[2]
Eletrochemical	MgCl ₂ and phenyl Phosphate	0-300UI/L	[14]
Eletrochemical	SAM of cysteine and AuCNT modified bound to an antibody	0.5-600 UI/L	Present work

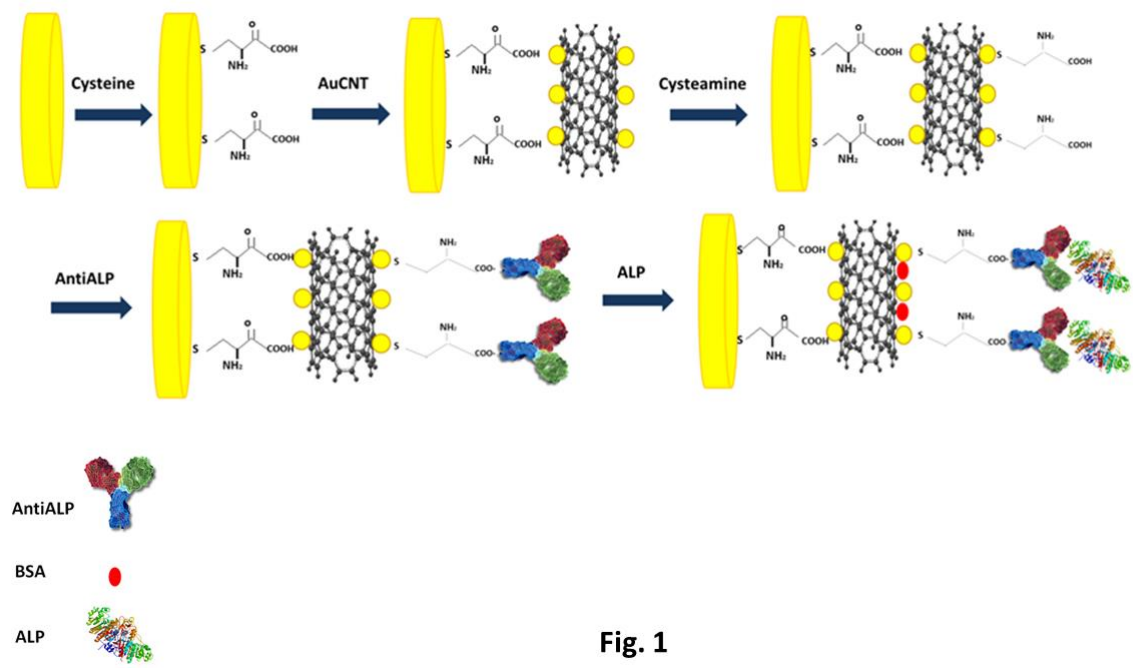
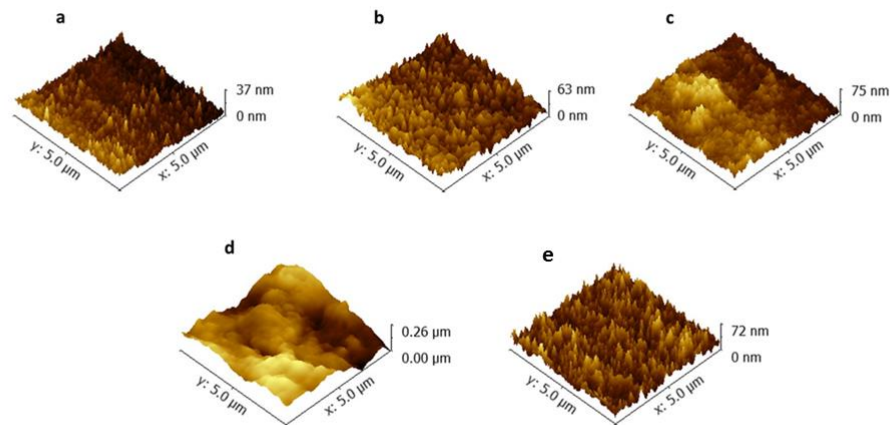


Fig. 1

**Fig. 2**

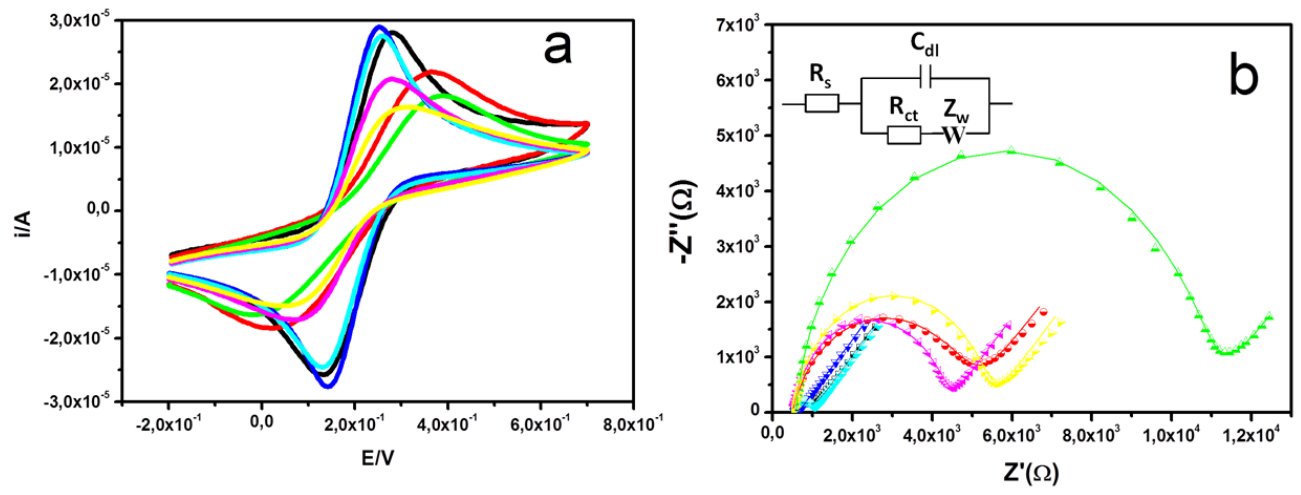


Fig. 3

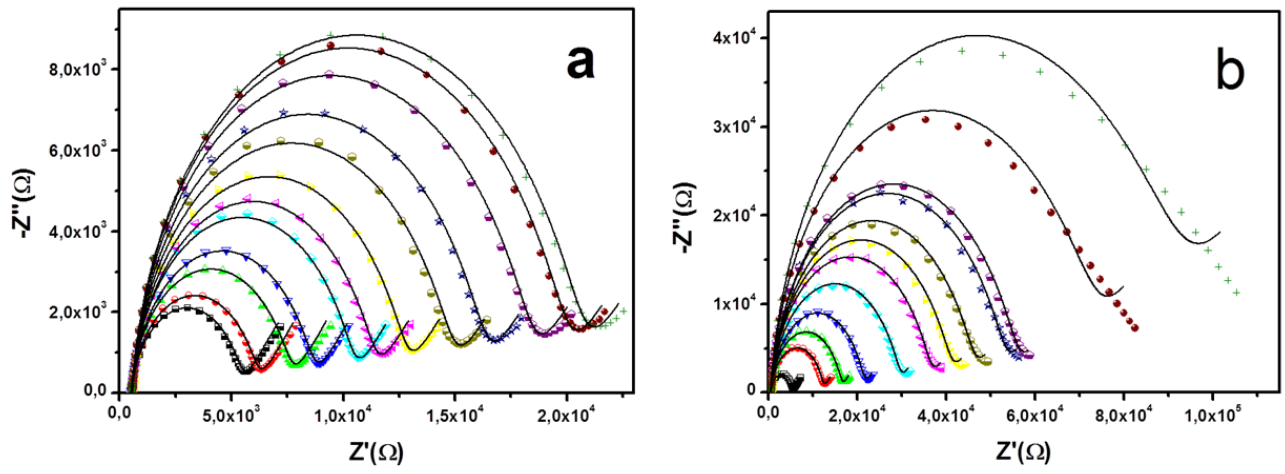


Fig. 4

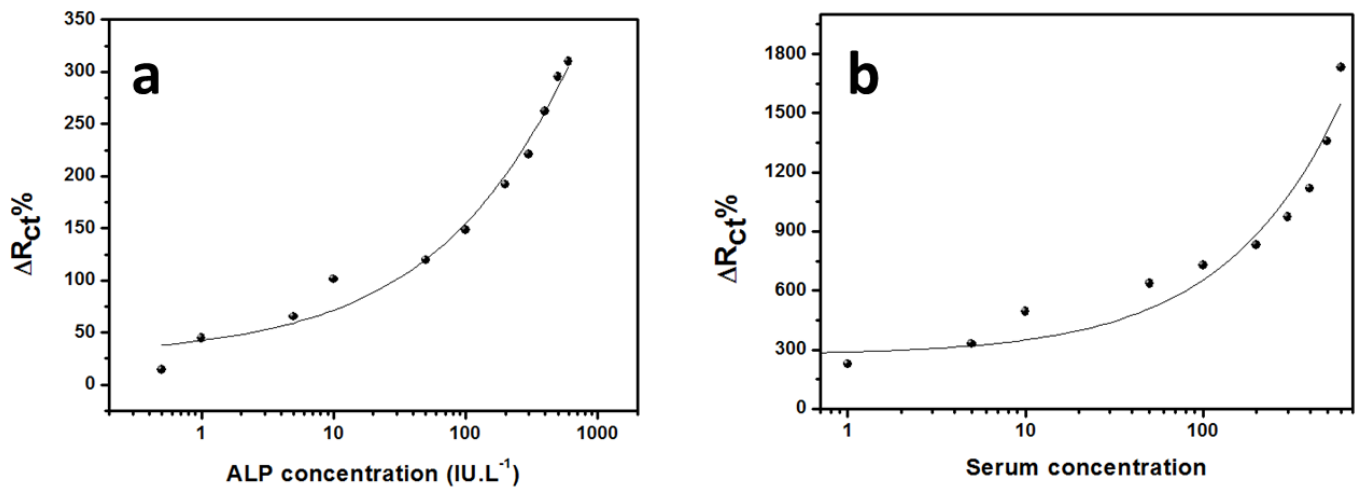


Fig. 5

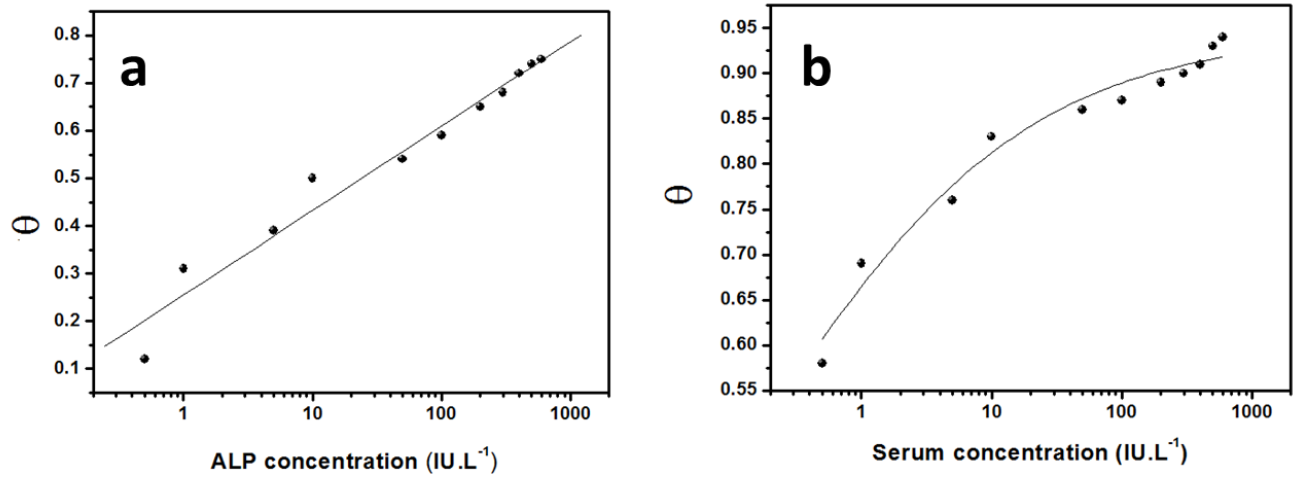


Fig. 6

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O imunossensor eletroquímico desenvolvido nesse trabalho, baseado em nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro foi sensível para uma larga faixa de concentrações de fosfatase alcalina sorológica variando de 0.5 a 600 UI.L⁻¹, apresentando seletividade para esta enzima, pois não apresentou um resultado significativo quando exposto a proteína C reativa.

As técnicas eletroquímicas de VC e EIE foram úteis para a determinação de cada etapa do desenvolvimento do biossensor, pois a partir das análises impedimétricas e voltamétricas foi possível acompanhar as modificações da superfície do eletrodo, por meio das alterações nos níveis de resistência a transferência de carga, que refletiu nos processos de adsorção a cada etapa de montagem do imunossensor, além da possibilidade de avaliar o biorreconhecimento da fosfatase alcalina sorológica demonstrando a interação efetiva entre os anticorpos com o analito de interesse.

A técnica do QCM não apresentou uma boa resposta piezoelétrica devido as características químicas da plataforma nanoestruturada, o que não favoreceu a total adsorção das moléculas, porém foi possível identificar o processo de interação entre antígeno e anticorpo pela diminuição da frequência do sistema das concentrações 50- 400 UI.L⁻¹ de ALP sorológica, demonstrando que o imunossensor piezoelétrico foi capaz de detectar a ALP na mesma escala de concentração dos testes convencionais.

Diante do trabalho apresentado é possível concluir que o imunossensor desenvolvido pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico e monitoramento de paciente portadores de doença arterial coronariana, assim como de outras patologias relacionadas a variação dos níveis sorológicos de fosfatase alcalina.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO-GÁMEZ, A. L. et al. A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 2, p. 3756–3767, 2014.
- ARDUINI, F. et al. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 179, p. 201–208, 2013.
- BARD, A. J. et al. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. 2nd ed. University of Texas at Austin. 1994.
- BIDMANOVA, S. et al. Fluorescence-based biosensor for monitoring of environmental pollutants: From concept to field application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 97–105, 2016.
- BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 94–98, 2013.
- CALVI, A. et al. Recognizing physisorption and chemisorption in carbon nanotubes gas sensors by double exponential fitting of the response. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, n. 5, 2016.
- CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK, M. K. Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. **Analytical Biochemistry**, v. 446, n. 1, p. 9–18, 2014.
- CHAUHAN, R. et al. Label-free piezoelectric immunosensor decorated with gold nanoparticles: Kinetic analysis and biosensing application. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 222, p. 804–814, 2016.
- CHEN, C. et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors. **RSC Advances**, v. 3, n. 14, p. 4473–4491, 2013.
- CHEQUER, G. et al. Original Article. v. 87, p. 84–90, 2006.
- CORTINA, M. E. et al. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 24–33, 2016.
- CUNG, H. et al. Characterization of a novel endothelial biosensor assay reveals increased cumulative serum inflammatory potential in stabilized coronary artery disease patients. **J Transl Med**, v. 13, n. 1, p. 99, 2015.
- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p.

970–979, 2004.

DULAY, S. et al. Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3852–3856, 2011.

FARKA, Z.; KOVÁŘ, D.; SKLÁDAL, P. Rapid detection of microorganisms based on active and passive modes of QCM. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 1, p. 79–92, 2015.

GUPTA, R. K. et al. Multiplexed electrochemical immunosensor for label-free detection of cardiac markers using a carbon nanofiber array chip. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 773, p. 53–62, 2016.

GUS, I. et al. Variations in the Prevalence of Risk Factors for Coronary Artery Disease in Rio Grande do Sul-Brazil: A Comparative Analysis between 2002 and 2014. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 6, p. 573–579, 2015.

GYURCSÁNYI, R. E. et al. Amperometric microcells for alkaline phosphatase assay. **The Analyst**, v. 127, n. 2, p. 235–240, 2002.

HU, Y. F.; ZUO, P.; YE, B. C. Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 43, p. 79–83, 2013.

IZAR, M. C. DE O. Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. v. 26, 2016.

JIANG, D. et al. Mast cell-based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 150–156, 2013.

JONO, S. et al. Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. **Circulation Research**, v. 87, n. 7, p. e10–e17, 2000.

KARAKAYA, C. et al. Serum IL-6 and CRP levels in patients with trauma involving low-extremity bone fractures. v. 18, p. 2013, 2013.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6401–6408, 2010.

KAVOSI, B. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 915–923, 2015.

KIM, H. J.; KWAK, J. Electrochemical determination of total alkaline phosphatase in human blood

- with a micropatterned ITO film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577, n. 2, p. 243–248, 2005.
- KIM, S.; CHOI, S. J. A lipid-based method for the preparation of a piezoelectric DNA biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 1–3, 2014.
- KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 2016.
- LAMBERTI, F.; GIOMO, M.; ELVASSORE, N. Electrochemical biosensing with carbon nanotubes. **Carbon Nanotubes: Growth**, n. 2005, 2011.
- LASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. **Electrochemical**, v. 32, p. 143–248, 1999.
- LI, C. M. et al. A gold nanoparticles-based colorimetric assay for alkaline phosphatase detection with tunable dynamic range. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, n. 1, p. 366–371, 2013a.
- LI, H. et al. Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, n. 1, p. 25–29, 2013b.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. **Immunoassays for aflatoxins** **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2009.
- LIBERMAN, M. et al. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications
Calcificação vascular: fisiopatologia e implicações clínicas. **Einstein**, v. 11, n. 3, p. 376–82, 2013.
- LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. **RSC Adv.**, v. 6, n. 30, p. 24995–25014, 2016.
- LIMA, L. M. et al. Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 83–86, 2007.
- LIN, Y.-C.; CHEN, Y.-C.; CHEN, L.-Y. Effect of Electrode Surface Modification by Sulfide on QCM Based Protein Biosensor. **Optics and Photonics Journal**, v. 3, n. 2, p. 305–307, 2013.
- LIU, G. et al. Nanoparticle-based biosensors and bioassays. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**, p. 441–457, 2008.
- LIU, Y.; YU, J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 1, p. 1–19, 2016.

- LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 565–572, 2015.
- LUO, Y. et al. A Single Biosensor for Evaluating the Levels of Copper Ion and L -Cysteine in a Live Rat Brain with Alzheimer's Disease. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 47, p. 14053–14056, 2015.
- MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460–471, 2013.
- MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.
- MORRIS, D. R. P. et al. Real-time monitoring of airborne cat allergen using a QCM-based immunosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 190, p. 851–857, 2014.
- MUHLESTEIN, J. B. et al. Effect of screening for coronary artery disease using CT angiography on mortality and cardiac events in high-risk patients with diabetes: the FACTOR-64 randomized clinical trial. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 312, n. 21, p. 2234–2243, 2014.
- NARISAWA, S. et al. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. **Journal of bone and mineral research**, v. 22, n. 11, p. 1700–1710, 2007.
- PEARCE, M. I. et al. Improvement of chronic osteomyelitis after granulocyte colony stimulating factor. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 29, n. 1, p. 48–51, 2013.
- PINHO, R. A. DE et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 549–555, 2010.
- POHANKA, M. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 12, p. 496–506, 2017.
- POLO, F.; TOFFOLI, G. Point-of-Care for Therapeutic Drug Monitoring of Antineoplastic Drugs. **Medicinal chemistry**, v. 6, n. 6, 2016.
- RAMNANI, P.; SAUCEDO, N. M.; MULCHANDANI, A. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 143, p. 85–98, 2016.
- RANDVIIR, E. P. et al. Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes. **The Analyst**, v. 138, n. 10, p. 2970–81, 2013.

- RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.
- REZAEI NIYA, S. M.; HOORFAR, M. Study of proton exchange membrane fuel cells using electrochemical impedance spectroscopy technique - A review. **Journal of Power Sources**, v. 240, p. 281–293, 2013.
- ROCHA-SANTOS, T. A. P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 28–36, 2014.
- ROMALDINI, C. C. et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 135–140, 2004.
- RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.
- RONKAINEN, N. J.; OKON, S. L. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers. **Materials**, v. 7, n. 6, p. 4669–4709, 2014.
- RUAN, C. M.; WANG, W.; GU, B. H. Detection of Alkaline Phosphatase Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 78, n. 10, p. 3379–3384, 2006.
- RUSHWORTH, J. V. et al. A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 83–90, 2014.
- SAAD, N. A. et al. Quartz crystal microbalance for bacteria application review. **2014 2nd International Conference on Electronic Design (ICED)**, n. January 2014, p. 455–460, 2014.
- SANTOS, G. S. et al. Impedimetric nanostructured genosensor for detection of schistosomiasis in cerebrospinal fluid and serum samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 137, p. 163–169, 2017.
- SCHMIDT, M. et al. Physisorption and chemisorption on silver clusters. **Chem Phys Chem**, v. 16, n. 4, p. 855–865, 2015.
- SCHOPPET, M.; SHANAHAN, C. M. Role for alkaline phosphatase as an inducer of vascular calcification in renal failure? **Kidney International**, v. 73, n. 9, p. 989–991, 2008.
- SEENIVASAN, R. et al. An electrochemical immunosensing method for detecting melanoma cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 508–515, 2015.
- SERAFÍN, V. et al. Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 195, p. 494–499, 2014.

- SHANTOUF, R. et al. Association of serum alkaline phosphatase with coronary artery calcification in maintenance hemodialysis patients. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 4, n. 6, p. 1106–14, 2009.
- SHARMA, A. et al. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, v. 519, p. 1213-1218, 2010.
- SHI, Y.; YANG, R.; YUET, P. K. Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst. **Carbon**, v. 47, n. 4, p. 1146–1151, 2009.
- SHIOI, A. Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Roles of Tumor Necrosis Factor-alpha and Oncostatin M Derived From Macrophages. **Circulation Research**, v. 91, n. 1, p. 9–16, 2002.
- SIKORA, A. et al. The development of the spatially correlated adjustment wavelet filter for atomic force microscopy data. **Ultramicroscopy**, v. 171, p. 146–152, 2016.
- SIMÃO, E. P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.
- SINGH, R.; SHARMA, A.; JANG, J. Electrical immunosensor based on dielectrophoretically-deposited carbon nanotubes for detection of influenza virus H1N1. **The Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5415–21, 2014.
- SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 127–133, 2016.
- STEFFENS, C. et al. Atomic Force Microscopy as a tool applied to nano/biosensors. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 6, p. 8278–8300, 2012.
- TAN, Y. et al. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. **Analytical Biochemistry**, v. 387, n. 1, p. 82–86, 2009.
- TARAWNEH, M. A.; AHMAD, S. H. **Characterization and Morphology of Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes Filled Thermoplastic Natural Rubber (TPNR) Composite**. Universiti Kebangsaan Malaysia, 2013.
- THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.
- VIEIRA, E. A. et al. Razão triglicéridos/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p.

113–118, 2011.

WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors.

Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications, p. 237–260, 2008.

WANG, J. H. et al. The detection of alkaline phosphatase using an electrochemical biosensor in a single-step approach. **Sensors**, v. 9, n. 11, p. 8709–8721, 2009.

WANG, L. et al. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*. **Food Chemistry**, v. 221, p. 776–782, 2017.

WANG, Y. et al. A label-free approach to kinetic analysis and high multiplex detection of targeted drugs with phase surface plasmon resonance imaging. **Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 1738–1744, 2015.

WANG, Z. L. **Nanomaterials for Nanoscience and Nanotechnology**. 2000.

YANG, C. et al. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 887, p. 17–37, 2015.

YAO, N.; WANG, Z. L. **HANDBOOK OF MICROSCOPY FOR NANOTECHNOLOGY**. 1st ed. New York. 2011.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 24–31, 2014.

YUAN, Y. J.; CHEN, Q.; LI, J. QCM-based immunosensor for determining immunoglobulin G. **RSC Adv.**, v. 6, n. 46, p. 40336–40342, 2016.

ZHANG, L.; LIU, L.; XIA, N. Electrochemical Sensing of Alkaline Phosphatase Activity Based on Difference of Surface Charge of Electrode. v. 8, p. 8311–8319, 2013.

ZHU, X.; JIANG, C. 8-Quinolyl phosphate as a substrate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase. **Clinica Chimica Acta**, v. 377, n. 1–2, p. 150–153, 2007.

APÊNDICE A- IMUNOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA DETECÇÃO DA ALP

Os imunossensores piezoelétricos são caracterizados pela diminuição da frequência de oscilação do cristal de quartzo que está diretamente relacionado com o aumento da massa líquida adsorvida na superfície desse cristal compondo o sistema piezoelétrico, essas análises podem ser realizadas em tempo real e possuem baixo custo, sendo assim uma técnica útil no desenvolvimento de sensores (AKTER, 2015).

8.1 Resultados e Discussão

8.1.1 Imunossensor Piezoelétrico

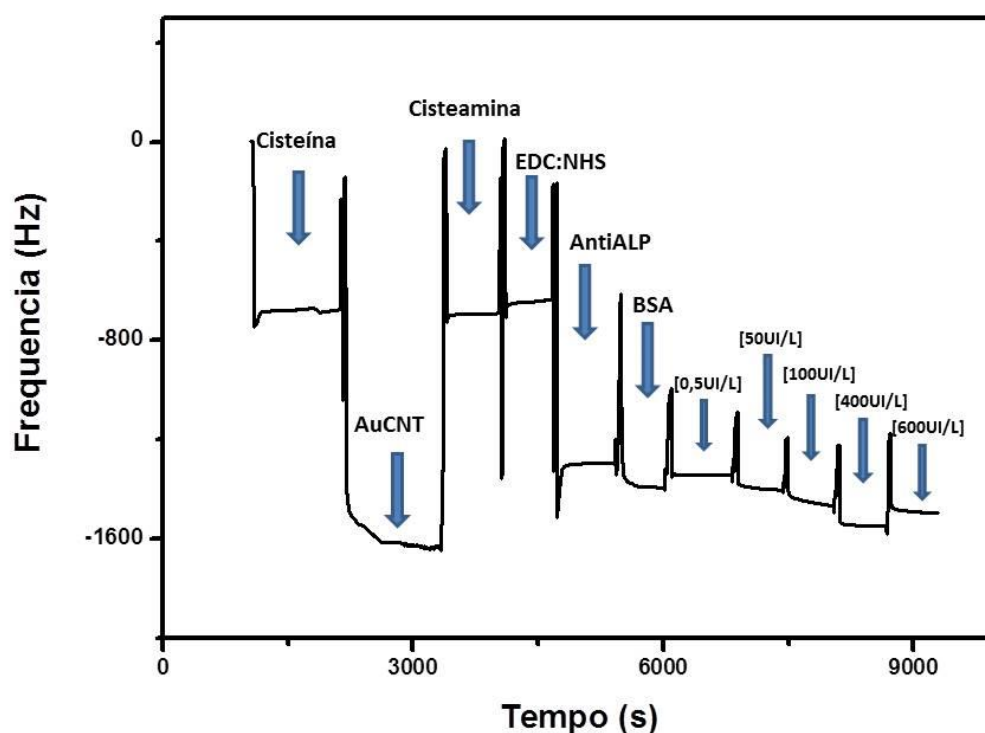
A adsorção de moléculas ao sistema piezoelétrico está vinculada a processos de funcionalização favorecendo assim a adesão de diversas partículas a superfície funcionalizada (WANG, 2017). Na figura 1 é demonstrado o desenvolvimento do imunossensor, primeiramente foi adsorvido a cisteína à superfície de ouro do cristal, formando um grupo tiol (S-H) favorecendo a formação de um filme ligado covalentemente ao ouro, este processo foi comprovado pela diminuição da frequência do cristal, demonstrando que ocorreu um aumento da massa líquida do sistema (SHA, 2012). Consecutivamente foi adicionado o AuCNT que provocou uma diminuição considerável da frequência do sistema, demonstrando a fisissorção do nanomaterial ao filme anteriormente depositado (XIE, 2014). Posteriormente foi adsorvida a cisteamina que promoveu a funcionalização do nanomaterial depositado, seguido do agente ativador EDC:NHS. Em seguida, com a adição dos antiALP observou-se uma grande diminuição da frequência de oscilação do cristal, comprovando a ligação covalente dos anticorpos a superfície nanoestruturada desenvolvida (AKTER, 2015; YANG, 2015). Para bloquear os sítios remanescentes foi adicionado o BSA resultando em uma pequena diminuição da frequência de oscilação.

8.1.2 Detecção piezoelétrica da ALP

O imunossensor foi exposto às concentrações de ALP sorológica (0,5; 50; 100; 400; 600 UI/L) onde foi possível observar uma diminuição gradativa da frequência do sistema piezoelétrico entre a concentração de 50 UI/L a 400UI/L (figura 1) comprovando a formação do imunocomplexo resultante do processo de biointeração entre o anticorpo e o analito de interesse, aumentando a massa líquida do sistema (LI, 2013). O imunossensor desenvolvido foi capaz de detectar a ALP

dentro da faixa clínica que varia entre 56-156 UI/L em adultos e 13-43 UI/L em crianças, sendo útil para o monitorando dessa enzima no soro humano.

Figura 1: Sensorgrama da montagem do imunossensor para detecção da ALP sorológica.



REFERÊNCIAS

AKTER, R. et al. A highly sensitive quartz crystal microbalance immunosensor based on magnetic bead-supported bienzymes catalyzed mass enhancement strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 66, p. 539–546, 2015.

LI, H., et al. Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3, **Biosens. Bioelectron**, v. 43, p. 25–29, 2013.

SHA, X. et al. Quartz Crystal Microbalance (QCM): Useful for Developing Procedures for Immobilization of Proteins on Solid Surfaces. **Anal. Chem.**, v. 84, n. 23, p. 10298–10305, 2012.

XIE, J. et al. QCM chemical sensor based on ZnO colloid spheres for the alcohols. *Sensors and Actuators B*, v. 203, p. 239–244, 2014.

WANG, L., et al. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*. **Food Chemistry**, v. 221, p.776–782, 2017.

YANG, Y. et al. A Label-Free Immunosensor for Ultrasensitive Detection of Ketamine Based on Quartz Crystal Microbalance. **Sensors**, v.15, n.4, p. 8540-8549, 2015.

PERSPECTIVAS

- Otimizar o imunossensor piezolétrico, realizando modificações químicas na plataforma nanoestruturada do sensor, o que pode possibilitar uma maior adsorção das moléculas a plataforma;
- Utilização de outros marcadores para avaliar a seletividade do imunossensor;
- Avaliar a possibilidade de imobilização de outras biomoléculas a plataforma nanoestruturada desenvolvida;
- Utilização de amostras de pacientes portadores de outras doenças inflamatórias, positivos e negativos para a confirmação da formação de processos de calcificação vascular.