



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## **Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C Reativa**

**Aluno:** Anderson José Gonzaga Lemos

**Orientador:** Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** João Marcos Madurro

**UBERLÂNDIA - MG**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C Reativa**

**Aluno:** Anderson José Gonzaga Lemos

**Orientador:** Ana Graci Brito Madurro

**Co-Orientador:** João Marcos Madurro

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L557d      Lemos, Anderson José Gonzaga, 1986-  
2014      Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de proteína c  
reativa / Anderson José Gonzaga Lemos . - 2014.  
52 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.  
Coorientador: João Marcos Madurro.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Proteína C - Teses. 3. Biossensores -  
Teses. 4. Aterosclerose - Teses. I. Madurro, Ana Graci Brito. II.  
Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## **Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C Reativa**

**ALUNO:** Anderson José Gonzaga Lemos

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Ana Graci Brito Madurro (Orientador)

**Examinadores:**

Jerusa Simone Garcia  
Foued Salmen Espindola  
Yara Cristina de Paiva Maia  
Reinaldo Francisco Teófilo

**Data da Defesa:** 29/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

(Ana Graci Brito Madurro)

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grato a Deus pela sua imensa misericórdia, pela guia durante toda minha vida, inclusive durante o andamento deste curso. Agradeço a minha família, especialmente minha mãe Neide Gonzaga Mendes, por sempre ter acreditado que eu poderia alcançar tudo isso, ao meu Pai Edivar César Lemos e ao meu irmão e companheiro de filosofia científica Jean Rivet Gonzaga Lemos. Agradeço também a minha esposa pela paciência, apoio e carinho concedido durante esta jornada. Sou grato a todos os colegas do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP), em especial Renata Alves Balvedi e Vinícius Rezende Rodovalho pelas instruções sábias em eletroquímica. Sou profundamente grato a Prof(a). Dra. Ana Graci Brito Madurro e ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, por terem me dado a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos nesta área incrível. Sem sombra de dúvida quando me referenciarem profissionalismo, cordialidade ou gentileza, os vossos nomes estarão entre os primeiros em minha mente.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura de um vaso sanguíneo corado com hematoxilina e eosina. (MESIA 2011) .....	5
<b>Figura 2</b> – Estruturação de um biossensor. (A) elemento biológico de reconhecimento, (B) representação de um conversor de sinal e (C) processador. (CALIL, 2010) .....	15
<b>Figure 1</b> – Cyclic voltammograms of grafite electrode in solutions of 3-aminotiophenol.....	35
<b>Figure 2</b> – Differential pulse voltammograms of 4-aminoantipirine.....	33
<b>Figure 3</b> – Calibration curve obtained for CRP using the oxidation signal of 4-aminoantipirine obtained with diferente concentrations of CRP.....	34
<b>Figure 4</b> –Differential pulse voltammograms of 4-aminoantipirine onto grsphite electrode modified with poly 3-aminotiophenol/anti-CRP in negative serum and positivo serum for the CRP .....	35
<b>Figure 5</b> – Atomic force microscopy images.....	35

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Classificação dos fatores de risco de acordo a importância ou controle dos mesmos. (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013) .....3

**Tabela 2.** Valores referenciais do perfil lipídico para adultos acima de 20 anos. (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2013).....8

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-ATP – do inglês “3-Aminothiophenol” (3-aminotiofenol)

4-APP – do inglês “4-Aminoantipyrine” (4-aminoantipirina)

AFM- do inglês “Atomic Force Microscopy” (Microscópio de Força Atômica)

CK – Creatina Fosfoquinase

CRP – do inglês “C Reaction Protein” (Proteína C Reativa)

CDR – do inglês “Complementary - Determining Regions” (Região Determinante de Complementariedade)

CH – do inglês “Heavy Chain” (Cadeia Pesada)

CL – do inglês “Light Chain” (Cadeia Leve)

CT – Colesterol Total

DCV – Doenças Cardiovasculares

GOT – Glutamato Oxaloacetato Transaminase

HDL–do inglês “High Density Lipoprotein” (Lipoproteína de Alta Densidade)

HDL–C – Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade)

LDL– do inglês “Low Density Lipoprotein” (Lipoproteína de baixa Densidade)

LDL- C – Colesterol de Lipoproteína de baixa Densidade

MCP– do inglês “Monocyte Chemoattractant Protein” (Proteína Químioatrativa de Monócitos)



NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

TG – Triglicérides

VCAM – do inglês “Vascular Cell Adhesion Molecule” (Molécula de adesão em célula vascular)

## SUMÁRIO

Apresentação.....	1
Capítulo I: Fundamentação teórica.....	2
1. Introdução.....	3
1.1. Doenças Cardiovasculares.....	3
1.2. Fisiologia Cardiovascular e Aterogênese.....	4
1.3. Análise Clínica das Doenças Cardiovasculares: Arteriosclerose.....	7
1.3.1. Lipidograma.....	8
1.3.2. Alterações Eletrocardiográficas.....	10
1.3.3. Alterações Hematológicas .....	11
1.3.4. Alterações enzimáticas séricas.....	11
1.3.4.1. Glutamato -Transaminase oxaloacetato (GOT).....	11
1.3.4.2. Creatinina fosfoquinase (CK ou CPK).....	12
1.3.4.3. Lactato Desidrogenase (LDH).....	12
1.3.4.4. Desidrogenase Alfa-Hidroxibutírica.....	13
1.3.4.5. Proteína C Reativa.....	13
1.4 Biossensores.....	14
1.5.1. Estrutura de um Biossensor.....	15
1.5.2. Componentes Biológicos dos Biossensores.....	16
1.5.3. Transdutores Utilizados em Biossensores.....	16
1.5.4. Características Estruturais das Imunoglobulinas.....	18
1.5.5. Bases Químicas da Interação Antígeno/Anticorpo.....	21
1.6. Técnicas de imobilização de Anticorpos.....	22
1.7. Adsorção.....	23
1.7.1. Ligação Covalente.....	23
1.7.2. Ligação Covalente Cruzada.....	23

1.7.3. Oclusão.....	24
Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo II: Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C	
Reativa.....	27
Resumo.....	26
Abstract.....	29
1 . Introduction.....	30
2. Experimental.....	31
2.2. Apparatus.....	31
2.3. Electrochemical polymerization of 3-aminothiophenol.....	32
2.4. Anti-CRP immobilization.....	32
2.5. Detection of the interaction anti-CRP:CRP.....	32
2.6. Analysis of sérum using the immunosensor.....	33
3. Results and discussion.....	33
3.1. Electrochemical behavior of 3-aminothiophenol.....	33
3.2. Immobilization and detection of the CRP target.....	34
3.3. Analytical performance of the immunosensor.....	35
3.4. Measuring of CRP target in human serum sample.....	36
3.5. Morphological characterization of the immunosensor using atomic force microscopy.....	37
4. Conclusions.....	38
Acknowledgments.....	38
References.....	38

## APRESENTAÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as mais epidêmicas em todo o mundo, apresentando os maiores índices de morbidade e mortalidade quando comparadas com outros processos crônicos. Este grupo de doenças são caracterizadas por determinarem alterações no coração, artérias e veias, sendo que o desenvolvimento de placa ateromatosa e o infarto agudo do miocárdio se destacam pela número de casos relatados. Várias estratégias são utilizadas na prática clínica para diagnosticar estes processos patológicos, entre eles o lipidograma, o eletrocardiograma e as dosagens séricas de proteínas/enzimas como creatinina fosfoquinase, lactato desidrogenase e proteína c reativa (CRP, do inglês c-reactive protein). CRP é uma macromolécula proteica de fase aguda que tem sido apontada como um dos fatores etiológicos mais importantes no processo de inflamação e formação de placa aterosclerótica. Esta macromolécula pertence a uma família de proteínas plasmáticas denominadas pentraxinas, as quais atuam na ativação de mecanismos do sistema imune inato, bem como no auxílio ao reconhecimento de antígenos estranhos. Por conseguinte, torna-se de grande relevância o desenvolvimento de novas estratégias utilizadas para detecção de CRP a partir de material biológico. Atualmente os biossensores tem se destacado como ferramentas extremamente eficazes na detecção de biomarcadores de processos patológicos. Estes dispositivos apresentam numerosas vantagens como elevada especificidade, seletividade, capacidade de miniaturização e resposta em tempo real. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um imunossensor eletroquímico para a detecção precoce de CRP, que pode ser aplicado no diagnóstico da aterosclerose. Para este fim foi utilizado um eletrodo de grafite quimicamente modificado com um polímero derivado do 3-aminotiofenol sintetizado com uso de voltametria cíclica, no qual foi imobilizado um anticorpo específico para CRP. As detecções foram realizadas indiretamente com voltametria de pulso diferencial utilizando o composto intercalante 4-aminoantipirina (4-AAP). Os resultados demonstram que o imunossensor desenvolvido tem capacidade de detectar CRP em amostras biológicas.

## **Capítulo I: Fundamentação Teórica**

## 1. Introdução

### 1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) tem-se destacado como uma das mais epidêmicas, estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todos os grupos étnicos (MESIA et al., 2011). O termo “doenças cardiovasculares” refere-se a um grupo de processos patológicos que envolvem diretamente disfunções no coração, artérias e veias, entre os quais destaca-se pelo elevado número de casos onde ocorre desenvolvimento de placa aterosclerótica e o infarto do miocárdio (JAVIER et al., 2013).

Os fatores associados ao risco elevado de desenvolvimento de DCV ocorrem de forma isolada ou em conjunto (Tabela 1). Dentre esses fatores clássicos destacam-se: história familiar do indivíduo, sexo, idade, tabagismo, hiperglicemia, obesidade, hipertensão, sedentarismo e níveis elevados de colesterol plasmáticos e hiperhomocisteinemia (MESIA et al., 2011).

Epidemiologicamente já é evidenciada que a somatória dos fatores de risco aumentam a probabilidade de eventos cardiovasculares, uma vez que cada um destes fatores soma-se a outro e eleva consideravelmente a mortalidade e morbidade (AURÉLIO et al., 2014).

Tabela I. Classificação dos fatores de risco de acordo a importância ou controle dos mesmos. Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013.

Fator de risco	Fatores de risco ótimos	Um fator de risco não ótimo	Fatores de risco elevados	Fatores de risco principais
Colesterol total	< 180 mg/dl	180-199 mg/dl	200-239 mg/dl	> 240 mg/dl
Pressão arterial sistólica (PAS)	Não tratada < 120 mmHg	Não tratada 120-139 mmHg	Não tratada 140-159 mmHg	Tratamento para HAS ou PAS não-tratada ≥ 160 mmHg
Pressão arterial diastólica (PAD)	Não tratada < 80 mmHg	Não tratada 80-89 mmHg	Não tratada 90-99 mmHg	Tratamento para HAS ou PAD não-tratada ≥ 100 mmHg
Fumo	Não	Não	Não	Sim
Diabetes	Não	Não	Não	Sim

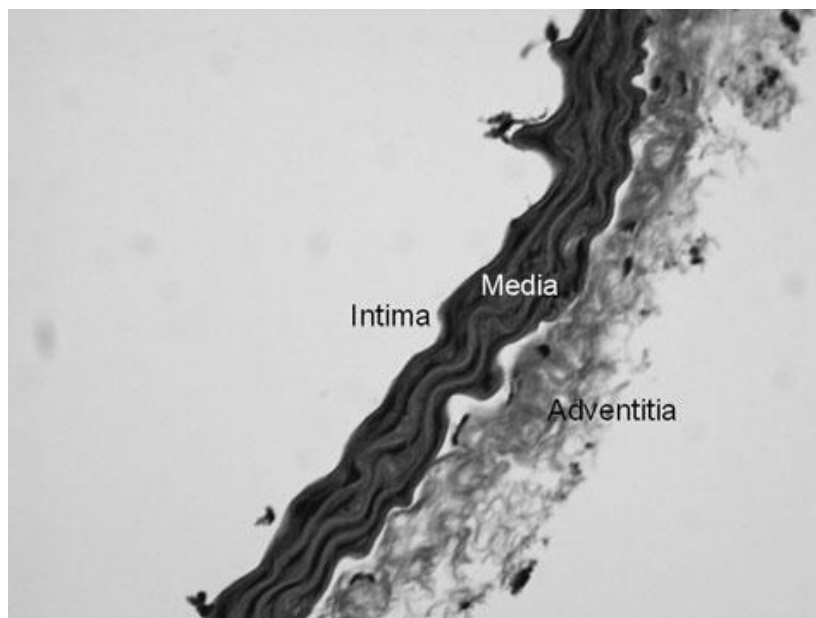
O risco de doença aterosclerótica é estimado com base na análise conjunta das características que aumentam as chances do indivíduo desenvolver a doença desta forma, o mais claro identificador de risco é a manifestação prévia da própria doença. Inúmeras são as estratégias adotadas para se identificar o risco de desenvolvimento deste processo patológico (KAMPOLI et al., 2009).

## **1.2. Fisiologia Cardiovascular e Aterogênese**

O organismo humano é constituído macroscopicamente por um conjunto de sistemas altamente adaptados, estruturado em diferentes níveis de organização, de forma que a totalidade do sistema está sempre a desempenhar atividades vitais, responsáveis pela manutenção da vida. Entretanto, para garantir a funcionalidade deste sistema, são necessários controles rigorosos e regulações precisas em todos os níveis de organização (MONTENEGRO et al., 2010). Assim, o corpo deve permanecer em um estado de constância funcional, ideal para a vida e manutenção das funções vitais, denominado homeostasia. O sistema cardiovascular humano contribui com a homeostase por meio dos transportes coordenados de nutrientes, oxigênio molecular, dióxido de carbono, produtos do metabolismo, eletrólitos e hormônios no nosso organismo (WAKE et al., 2013).

O sistema cardiovascular é constituído por três componentes básicos: (1) coração (2) vasos sanguíneos e (3) sangue. O transporte de sangue por meio das estruturas cardiovasculares ocorre por três vias: sistema arterial de transporte, sistema capilar, e sistema venoso. O vaso sanguíneo, estrutura cilíndrica tubular que comporta o plasma, é composto por três camadas denominadas íntima, média e adventícia (Figura 1). A íntima é a camada mais contínua, a qual é semipermeável e composta por uma única camada de células endoteliais escamosas que revestem a luz dos vasos sanguíneos (VITIELLO et al., 2014). As células endoteliais são orientadas paralelamente ao comprimento do vaso, se encaixando umas às outras e se comunicando por meio de junções que permitem interações químicas e eletrofisiológicas. A íntima está rodeada por uma delgada camada elástica interna. Por sua vez, a camada de músculo medial é a

mais espessa,consistindo de células musculares lisas que servem como componente contrátil (MESIA et al., 2011).



**Figura 1.** Estrutura de um vaso sanguíneo corado com hematoxilina e eosina.

Fonte: Mesia 2011

Ao contrário dos miócitos cardíacos, as células musculares lisas não possuem sarcômero, no entanto possuem actina e filamentos de miosina que são responsáveis pela contração celular. A adventícia possui uma camada externa de fibroblastos, que fazem parte de uma estrutura protetora feita de tecido conjuntivo e adiposo. Além disso, neste local estão presentes as inervações neuronais. Caracteristicamente cada camada possui fibras elásticas e colágenas que compõem a matriz extracelular, esta composição permite haver distensibilidade do sistema em resposta a mudanças na pressão intravascular (BERAIA, 2010).

Os vasos sanguíneos atuam na manutenção da pressão intra-arterial e na distribuição de sangue. Esta atividade é mantida por meio das atividades coordenadas do sistema nervoso autônomo, sistema hormonal e fatores endoteliais que regulam a contração e dilatação do vaso. O endotélio libera várias substâncias vasoativas. Uma das principais moléculas produzidas é o óxido nítrico (NO). Esta molécula é produzida pela célula endotelial vascular a partir do



estereoisômero levógiro da arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOs)(VITIELLO, 2014; MICHAEL, 2013).

Além de promover vasodilatação, o NO inibe a agregação plaquetária, impede a proliferação do músculo liso e regula o recrutamento vascular de leucócitos. A endotelina 1 tem efeito antagônico ao NO, desencadeando vasoconstrição vascular. Na presença dos fatores clássicos de risco cardiovascular, bem como de vários indutores inflamatórios, desencadeia-se uma série de fenômenos moleculares que culmina com a diminuição ou perda da proteção da estrutura e fisiologia normal do endotélio, isto faz com que o vaso, progressivamente tenha tendência à constrição, processos inflamatórios, formação de trombos e proliferação celular desorganizada (STONER, 2013; VITIELLO, 2014).

A capacidade de um vaso expandir em resposta ao aumento de pressão na parede vascular, bem como o de manter um fluxo sanguíneo adequado é fundamental para a manutenção da vida de todos os tecidos do corpo e qualquer desajuste funcional ou estrutural nesse sistema, como a formação de placa aterosclerótica arterial constitui um sério agravamento à saúde com elevado risco de vida.

A aterosclerose é um processo patológico que envolve disfunção endotelial e processo inflamatório crônico das grandes artérias, considerado um dos grandes precursores de doença cardiovascular (STONER, 2013; MICHAEL, 2013)

Fisiopatologicamente o processo de formação da placa aterosclerótica (aterogênese) envolve o influxo de macrófagos do plasma sanguíneo para o espaço subendotelial do vaso. Este acúmulo de macrófagos está vinculado à presença de LDL e colesterol infiltrados neste tecido (MORE e TABAS, 2011).

Uma vez presentes no espaço subendotelial estas células fagocitam material do meio, na maior parte constituída por LDL, ao fazerem isto estas populações de células infiltradas vão se convertendo nas chamadas células espumosas, ricas em lipídeo intracitoplasmático, que estão presentes na região íntima arterial. A ideia mais aceita é que o excesso de LDL plasmático ao chegar na região íntima arterial, se oxida em consequência da presença de radicais livres gerados por disfunção endotelial, entre outros fatores. As LDL oxidadas induzem a migração de monócitos que fagocitam o material e se transformam em células espumosas (VITIELLO, 2014; MORE e TABAS, 2011).

### **1.3. Análise clínica das doenças cardiovasculares: Arteriosclerose**

O termo arteriosclerose refere-se a um grupo de processos patológicos que se caracterizam pela perda das funções das artérias em função do espessamento e perda progressiva da elasticidade desses vasos. Considera-se que existam três variantes morfológicas da doença: (1) aterosclerose, (2) esclerose calcificada da túnica média e (3) arteriolosclerose. A arteriosclerose da túnica média não possui grande relevância clínica. A arteriolosclerose está associada com a hipertensão arterial. Deste grupo a aterosclerose destaca-se pela sua incidência na população mundial. Este processo patológico desenvolve-se a partir da deposição local de placas compostas de fibras e lipídeos denominadas ateromas. Teoricamente qualquer órgão ou tecido pode sofrer um processo aterosclerótico, no entanto sua maior incidência ocorre nos vasos do coração, cérebro, e rins (VITIELLO, 2014; MILLER, 2007)

A aterosclerose é a principal causa de oclusão arterial. Esta oclusão ocorre principalmente por trombose coronariana, crescimento de placas ateromatosas ou hemorragia intratecidual que diminui o lúmen do vaso até sua obstrução. O infarto do miocárdio é um processo patológico associado ao ventrículo esquerdo, mas pode se estender até o ventrículo direito e aos átrios. Quando o vaso se estreita a ponto de não permitir o fluxo sanguíneo, como na obstrução coronariana aterosclerótica ocorre isquemia, a qual se caracteriza pela insuficiência ou ausência de fluxo sanguíneo para o coração (STONER, 2013; MILLER, 2007). Nestas condições o tecido muscular cardíaco não recebe um suprimento adequado de oxigênio molecular, iniciando-se um quadro de anóxia tecidual. A insuficiência funcional do coração se instala pelo fato da anóxia interferir no processo de fosforilação oxidativa da cadeia transportadora de elétrons presente na membrana interna das mitocôndrias das células lisas musculares cardíacas.

Na ausência de oxigênio, a produção de ATP pelas células do coração ainda prossegue por alguns segundos pela atividade da glicólise anaeróbia, no entanto se a isquemia e conseqüentemente a anóxia persistir, em poucos segundos a quantidade de ATP no meio intracelular chega a um nível insuficiente para manter a atividade contrátil desse músculo, causando necrose (MONTENEGRO, 2010; MILLER, 2007). Esta morte celular, isto é necrose, pode

ocorrer em uma pequena extensão do miocárdio, no entanto como a contratilidade dos miócitos é sistemática, interdependente, a lesão localizada prejudica todo o tecido tendo as mesmas consequências de uma necrose em múltiplas regiões. Denomina-se infarto transmural ou subendocárdico aquele que compromete toda a espessura do músculo cardíaco, e não-transmural o que não se estende por toda a espessura da parede ventricular, localizando-se geralmente no terço interno do miocárdio. A área afetada, isto é, na qual houve a morte das células é denominada infarto. No laboratório clínico são utilizados vários parâmetros bioquímicos para diagnóstico e prognóstico desse processo patológico, os principais são o lipidograma, eletrocardiograma, índices hematológicos e séricos (MILLER, 2007; WAKE, 2013).

### 1.3.1 Lipidograma

Devido a relação fisiopatológica existente entre hiperlipidemia e desenvolvimento de aterosclerose, a avaliação laboratorial dos teores de lipídeos no plasma são muito usuais na prática clínica. Quando esta dosagem é requerida, utiliza-se como triagem a dosagem de colesterol total e triglicerídeos plasmáticos em uma amostra de sangue com o paciente em jejum, porém sem ter alterado sua dieta normal nesse período de avaliação. Os valores normais dessas frações lipídicas estão indicados na tabela II.

**Tabela II.** Valores referenciais do perfil lipídico para adultos acima de 20 anos. Fonte: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2013.

Lípides	Valores (mg/dL)	Categoria
CT	< 200	Desejável
	200 – 239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-C	< 100	Ótimo
	100 – 129	Desejável
	130 – 159	Limítrofe
	160 – 189	Alto
	≥ 190	Muito Alto
HDL-C	> 60	Desejável
	< 40	Baixo
TG	< 150	Desejável
	150 – 200	Limítrofe
	200 – 499	Alto
	≥ 500	Muito Alto
Colesterol não-HDL	< 130	Ótimo
	130 – 159	Desejável
	160 – 189	Alto
	≥ 190	Muito Alto

Se os valores destes parâmetros estiverem dentro de limites estabelecidos como normais, ou seja, colesterol total menor que 200 mg/dl, colesterol de LDL menor que 100 mg/dl com HDL maior que 60 mg/dl, bem como triglicérides abaixo de 150 com colesterol entre 150 e 159 mg/dl, nestes casos não haverá obrigatoriamente necessidade de avaliações ou estudos adicionais. No entanto se houver alteração quando comparado aos valores de referência torna-se necessário um estudo mais minucioso do metabolismo lipídico, como por exemplo um estudo eletroforético das lipoproteínas plasmáticas (PIETRUCHA, 2011; MILLER, 2007). Na avaliação clínico-laboratorial o quadro de hiperlipidemia é classificado em: (a) primário ou (b) secundário. Geralmente as hiperlipidemias primárias são determinadas por fatores nutricionais ou ambientais, ou estão associadas com quadros metabólicos de hiperlipoproteinemias. Considera-se que a maior parte dos quadros de hiperlipidemias seja determinado pela dieta e secundariamente a fatores genéticos ou epigenéticos. Inúmeros processos patológicos podem ser um fator determinante de hiperlipidemia secundária, estes destaca-se o diabetes mellitus, ingestão de etanol, pancreatite, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, bem como gravidez ou uso de anovulatório e hepatopatia obstrutiva (DANA, 2009; MILLER, 2007).

Com relação ao gênero, a maior parte das alterações lipídicas ocorrem nos homens que sofreram infarto do miocárdio ou tiveram elevação de sua massa corporal após a fase adulta, e em mulheres obesas. Em indivíduos jovens com idade inferior a 25 anos, um teor de colesterol superior a 220 mg/100 ml ou de triglicérides acima de 150mg/100ml é indicativo de hiperlipidemia e sugere que haja uma avaliação clínica mais sucinta das possíveis causas desencadeadora de hiperlipidemias secundárias. A hipercolesterolemia é um dos parâmetros mais estudados do metabolismo lipídico no que diz respeito ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sua elevação para valores superiores a 260 mg/100 ml em homens entre idades de 30 e 49 anos eleva consideravelmente o risco de infarto (PIETRUCHA, 2011; MILLER, 2007).

Existe uma relação estreita entre arteriosclerose e infarto do miocárdio, uma vez que o mecanismo fisiopatológico desta doença envolve a obstrução de vasos, seja por espessamento da parede vascular seja pelo desprendimento de placas

ou coágulos fibrolipídicos, interferindo no fluxo sanguíneo normal do tecido cardíaco (isquemia) que pode induzir dor difusa no peito (angina pectoris) e infarto do miocárdio. As lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade ( LDL,do inglês Low Density Lipoprotein) relacionam-se com o desenvolvimento de cardiopatia isquêmica no mesmo grau que o colesterol. A maioria dos estudos sugere que a hiperlipidemia representa um risco com maior significância em idades abaixo de 50 anos, independentemente de obesidade, hipertensão e diabetes. Outro parâmetro correlacionado diz respeito aos níveis de HDL ( do inglês, High-Density Low) cuja relação nível/doença cardiovascular é benéfica. Desta forma, a dosagem do colesterol ligado à HDL é de grande valor clínico para avaliar o risco de cardiopatia isquêmica (DANA, 2009; MILLER, 2007).

### **1.3.2. Alterações eletrocardiográficas**

Um par de eletrodos superficiais colocados sobre o coração registra um padrão cíclico, portanto repetitivo de potencial eletrocardiofisiológico. À medida que os potenciais de ação se propagam dos átrios aos ventrículos a voltagem entre os eletrodos varia, expondo um perfil eletrofuncional da atividade propulsora do músculo cardíaco. Como o corpo é um bom condutor de eletricidade, uma vez que os fluidos possuem altas concentrações de eletrólitos as diferenças de potencial conduzidas até a superfície do corpo podem ser registradas por eletrodos superficiais colocados sobre a pele. O perfil eletroquímico registrado pela atividade do coração denomina-se eletrocardiograma. Este registro é de grande relevância para o acompanhamento do indivíduo. As principais alterações eletrocardiográficas observadas ocorrem nas ondas T (Isquemia),segmentos ST(lesão) e dos complexos intraventricular. Em adição pode utilizar-se arteriografia computadorizada para se evidenciar a obstrução por arteriopatia coronariana(WAKE, 2013; PIETRUCHA, 2011, MILLER, 2007).

### **1.3.3. Alterações hematológicas**

Para se avaliar as condições fisiopatológicas do sangue periférico, uma lâmina contendo amostra sanguínea corada é avaliada ao microscópio óptico por um analista-clínico. Denomina-se leucograma a avaliação do sangue corado pelo método Giemsa a qual permite enumerar diferencialmente os glóbulos brancos

presentes nessa amostra. Denomina-se leucocitose a elevação do número total de leucócitos acima de  $9.000/\text{mm}^3$ . A leucocitose pode ser devido a um aumento de um único tipo celular ou de todas as células como um todo, destacando-se pela sua importância o aumento dos neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. No infarto do miocárdio observa-se leucocitose desde as primeiras horas e após o processo, desaparecendo se o quadro for revertido. Os valores na contagem de leucócitos variam entre 12.000 a 15.000  $\text{mm}^3$  de leucócitos, onde um valor igual ou superior 20.000 é condizente com complicação do quadro patológico (SOFIA, 2013; MILLER, 2007).

#### **1.3.4. Alterações enzimáticas séricas**

A dosagem do nível de enzimas séricas tem se mostrado como uma relevante ferramenta no diagnóstico do infarto do miocárdio e no monitoramento de sua progressão. As principais enzimas séricas utilizadas no diagnóstico em infarto miocárdico são: creatina-fosfoquinase (CK ou CPK), glutamato-oxalacetato transaminase (GOT), desidrogenase alfa-hidroxibutírica (alfa-HBDH) e lactato desidrogenase (LDH) (MILLER, 2007), descritas a seguir.

##### **1.3.4.1. Glutamato -oxaloacetato transaminase (GOT)**

Estima-se que a atividade desta enzima eleva em cerca de 97% dos indivíduos com lesão miocárdica induzida por infarto. Após a lesão isquêmica do miocárdio, em 6 a 8 horas, estas enzimas são detectadas no plasma. Os níveis máximos são encontrados após cerca de 24 horas, o qual diminui gradativamente quatro a cinco dias após o processo se não ocorrer nova indução fisiopatológica isquêmica. Níveis de 400 a 500 UI (unidades internacionais) estão relacionados com morte, e são diretamente proporcionais ao grau de necrose alcançado pela anóxia tecidual miocárdica (MILLER, 2007).

##### **1.3.4.2. Creatina-fosfoquinase (CK ou CPK)**

Estas enzimas se elevam rapidamente, geralmente entre quatro a seis horas após o início do quadro, voltando ao normal após decorridos cerca de 36 horas. Como o uso de fármacos intramusculares pode induzir sua elevação, torna-se necessário a identificação de suas formas isoenzimáticas para se

diferenciar especificamente as de origem muscular estriada esquelética e as cardíacas. Estas moléculas enzimáticas são fosforilases músculo-específicas as quais atuam na transferência de fosfato proveniente da creatina. Além de estar presente no músculo cardíaco, são encontradas no músculo estriado esquelético e no cérebro. Embora possa ser utilizado no diagnóstico de miocárdio, este marcador pode se elevar em outros processos como a distrofia muscular. CPK é um dímero constituído por subunidades de dois tipos B (do inglês brain; cérebro) e M (músculo estriado). Quando a teor de CPK se eleva acima de 160 U/l e a atividade da CPK-MB (miocárdio) supera 5% da atividade total de CPK (MILLER, 2007).

#### **1.3.4.3. Lactato desidrogenase (LDH)**

Os níveis sorológicos elevam cinco vezes quando comparados aos valores normais após evento do infarto, geralmente após 12-24 horas. A dosagem desta enzima combinada com as de CPK eleva a especificidade e sensibilidade da análise clínica referente ao infarto agudo do miocárdio. Estruturalmente a LDH é um tetrâmero constituído por dois tipos de subunidades: H (Heart) e M (Músculo). A combinação destas cadeias polipeptídicas determina as diferentes formas isoenzimáticas da LDH. Existem cinco combinações possíveis dessas subunidades chamadas LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> e LDH<sub>5</sub> que podem ser diferenciadas por técnicas eletroforéticas. No músculo cardíaco encontra-se as isoenzimas LDH<sub>4</sub> e LDH<sub>5</sub>. Após infarto do miocárdio estas isoformas se elevam e permanecem mesmo após a normalização da LDH total. Como estas enzimas não se alteram durante a angina, a dosagem pode diferenciar as condições fisiopatológicas do sistema cardiovascular (MILLER, 2007).

#### **1.3.4.4. Desidrogenase alfa-hidroxibutírica**

É utilizada como um indicador indireto da atividade de lactato desidrogenase uma vez que rabdomiólise ou lesão muscular, bem como citólise eritrocitária podem determinar resultados falso-positivos. As concentrações mais elevadas ocorrem em média de 48 horas após o evento necrótico do músculo cardíaco (MILLER, 2007).

#### **1.3.4.5. Proteína c reativa (CRP)**

Em 90% dos casos de infartos transmuralis, o teste positivo para PCR é encontrado. Começa a ser detectável 12 horas a 5 dias após o episódio agudo, permanecendo positivo até 14 a 50 dias (MILLER, 2007).

A Proteína C Reativa (CRP, do Inglês C-reaction protein) é uma macromolécula proteica de fase aguda e tem sido apontada como um dos fatores etiológicos mais importantes no processo de inflamação e formação de placa aterosclerótica. Possui massa molecular de 115.135 Daltons, é composta por cinco subunidades dispostas em simetria planar, a qual determina um elevado grau de estabilidade a molécula deixando-a resistente a degradação enzimática.

A CRP pertence a uma família de proteínas plasmáticas denominadas pentraxinas, as quais atuam na ativação de mecanismos do sistema imune inato, bem como no auxílio ao reconhecimento de antígenos estranhos (TERRY, 2013).

As principais representantes das pentraxinas em seres humanos são a proteína C Reativa e o componente P amilóide (SAP, do inglês serum Amyloid P component). Foi demonstrada que CRP possui a capacidade de interagir com certos ligantes expressos em tecidos danificados, bem como alguns presentes na superfície de certas bactérias (TERRY, STONER, 2013).

Quando ocorre lesão tecidual evidencia-se uma maior exposição de grupos polares da fosfatidilcolina, um glicerofosfolípídeo derivado do glicerol o qual apresenta fosfato esterificado ao álcool colina. Este grupo não é normalmente acessível em células normais, desta forma, quando ocorre danos às membranas celulares, como por exemplo por ação enzimática, observa-se uma abundante ligação de CRP a membrana danificada. Esta funcionalidade da CRP foi observada quando na indução do infarto agudo do miocárdio, na qual observou-se a ligação destas moléculas a artéria coronária. Além disso, CRP também se liga grupos de fosfocolina sobre o LDL oxidado, o que pode explicar a presença desta molécula em lesões ateroscleróticas. Outros efeitos da CRP é aumento da expressão de VCAM-1, ICAM-1, selectina-E e MCP-1 em células endoteliais. Por consequência disto o CRP é um dos biomarcadores utilizados no processo de monitoração terapêutica na predição ou diagnóstico de processo aterosclerótico (STONER, 2013).

É importante ressaltar que grande parte dos processos patológicos são de progressão “silenciosa”, subclínica, idiopática, de tal forma que a manifestação



fisiológica ocorre muitas vezes quando em fase avançada da doença. O uso de biomarcadores é de grande relevância pelo fato de permitir avaliar o perfil biológico do paciente, monitorando e avaliando o estado de saúde do indivíduo antes da exteriorização fisiopatológica. Desta forma é indispensável a utilização de novas estratégias que possam ser empregadas como ferramenta no diagnóstico precoce de doenças (STONER et al.,2013). A produção de biossensores para o diagnóstico molecular de doenças tem sido muito utilizado para aplicação em clínica.

#### **1.4 Biossensores**

Os biossensores são dispositivos que utilizam a especificidade das reações biológicas para detecção de analitos-alvo (WANG, 2000). Para tal, estes utilizam-se de um aparato do qual fazem parte um ou mais componentes de natureza biológica, o qual estará fixado e irá interagir com o substrato alvo. Este componente biológico pode ser uma macromolécula proteica, fragmento de DNA ou células, o qual estará fixado na superfície de um eletrodo que por sua vez conecta-se a um transdutor físico, que converte os processos bioquímicos em sinais passíveis de mensuração (PATHAK et al., 2007).

Muitas vezes o eletrodo é quimicamente modificado com o intuito de elevar a capacidade de fixação da molécula biorreceptora sobre a superfície deste (GOPINATH, 2014). Devido as relevantes propriedades intrínsecas deste sistema, tais como a elevada especificidade e seletividade, seu uso é de grande aplicação para o diagnóstico de processos patológicos diversos, uma vez que alterações clínico-laboratoriais no indivíduo doente muitas vezes precede a exteriorização semiológica (MILLER, 2007).

##### **1.5.1. Estrutura básica de um biossensor**

Conforme citado anteriormente, um biossensor compõe-se basicamente por (1) elemento biológico de reconhecimento, (2) um transdutor e adicionalmente uma (3) unidade conversora de sinal. No sistema de reconhecimento existe uma biomolécula podendo ser uma enzima, imunoglobulina, ácido nucléico, aptâmero e outras (figura 2).

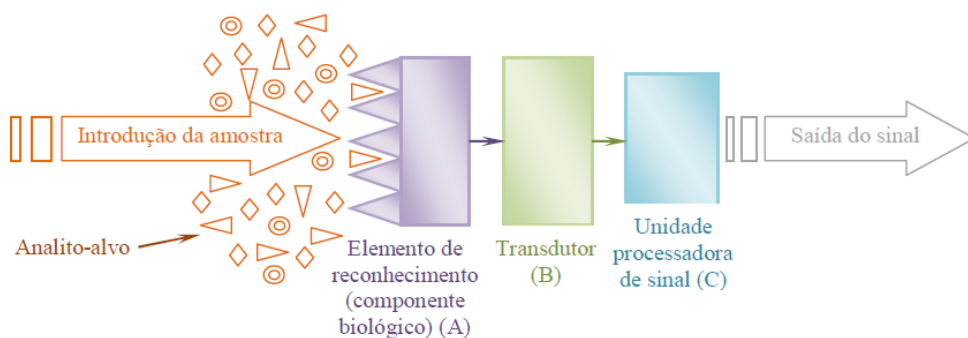


Figura 2. Estruturação de um biossensor. (A) elemento biológico de reconhecimento, (B) conversor de sinal e (C) processador. Fonte: CALIL, 2010.

Como este biocomponente está fixado sobre uma superfície, o sensor desempenha a tarefa de detectar a interação do elemento de reconhecimento com seu alvo. O transdutor desempenha o papel de monitorar as alterações físico-químicas desencadeadas pela interação da biomolécula e seu alvo. Esta complementaridade entre elemento de reconhecimento e alvo pode gerar modificações que deverão ser convertidos em um sinal passível de mensuração como onda eletromagnética, calor, alterações de massa, ou intensidade de corrente elétrica (GOPINATH, 2014).

### 1.5.2. Componentes Biológicos dos Biossensores

A principal característica de um biossensor é a especificidade para um analito, para tal é imprescindível a utilização de um componente biológico de reconhecimento (VESTERGAARD et al., 2007). O uso de proteínas com função enzimática ou transportadora é de grande aplicabilidade na construção de biossensores, principalmente as enzimas uma vez que muitas das reações catalisadas por estas macromoléculas variam em comportamento, podendo determinar em concomitância ao processo reativo a produção de prótons, oxido-reduções, liberação de ondas eletromagnéticas, e calor e outros produtos que podem ser mensurados. Por sua vez as imunoglobulinas, as quais são macromoléculas proteicas produzidas pelos plasmócitos ativados, são funcionalmente definidos pelo tipo de antígeno com o qual reagem. As imunoglobulinas ou anticorpos são proteínas constituídos pela associação de

cadeias pesadas(H) e leves(L), com regiões constantes e variáveis (que se liga ao antígeno), alguns aminoácidos desta região formam “bolsas” de interação com o antígeno (BARCLAY, 2013).O uso de anticorpos como sonda se baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo.Tais dispositivos são denominados imunossensores.A utilização de ácidos nucleicos também é comum. Neste tipo de biossensor uma cadeia oligonucleotídica é imobilizada na superfície de um eletrodo como elemento de reconhecimento, o comprimento da cadeia influencia a interação com seu alvo,o qual é feito pelo princípio de complementariedades de bases nitrogenadas dos pares AT e CG (WAN et al., 2013).

### **1.5.3. Transdutores utilizados em biossensores**

A função do transdutor é medir as mudanças físicas ou químicas que ocorrem na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável,como onda eletromagnética, calor, massa, condutância ou intensidade de corrente elétrica. Existem diversos, tais como o eletroquímico, óptico, piezoelétrico e calorimétrico.

**Transdutor Eletroquímico**– Neste tipo de transdução a captação de sinal é gerada pelo movimento de cargas (íons e elétrons) de espécies eletroativas do sistema.São os biossensores mais comumente utilizados em monitoramento e diagnóstico clínico-laboratorial.Suas principais vantagens são baixo custo, alta sensibilidade, screening rápido e estabilidade. Podem ser amperométricos, potenciométricos ou condutimétricos.

**Amperométricos** - Baseia-se na medida de corrente resultante da oxidação-redução de espécies eletroativas,onde uma espécie pode perder ou receber elétrons segundo suas propriedades físico-químicas. A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito e pode ser controlada pela aplicação de um potencial elétrico no eletrodo.Uma célula amperométrica pode conter dois ou três eletrodos.

**Potenciométricos**- Baseados na determinação da diferença de potencial entre o

eletrodo de trabalho e o de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, em que não há fluxo de corrente significativa entre eles.

**Condutimétricos**- Baseados na medição de mudanças na condutância, devido ao uso de enzimas que catalisam reações que produzem ou consomem espécies iônicas, alterando a quantidade de moléculas transportadoras de carga no eletrólito..

**Ópticos** – Fibra óptica, guia de onda planar, ressonância de superfície de plasma (SPR – surface plasmon resonance). São particularmente atraentes para aplicação em sistemas de detecção direta. São baseados na medição da luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica. Em tais biossensores, fibras ópticas são usadas para guiar as ondas de luz a detectores adequados, como um eletrodo ou semicondutor.

**Piezoelétricos** – Alteração de massa ou microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica. Baseia-se no princípio de revestir a superfície do biossensor com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente. A superfície revestida é colocada em uma solução contendo analitos, os quais se ligam à substância ligante. Então, a massa do cristal aumenta enquanto a frequência de ressonância das oscilações diminui proporcionalmente. Cristais de quartzo têm sido muito utilizados em sistemas piezoelétricos, pois sua frequência pode oscilar na faixa de megahertz (10<sup>6</sup> ciclos/segundo) de maneira proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa.

**Calorimétricos** – Detectam substratos baseados no calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. A forma mais utilizada acopla as substâncias diretamente, que detecta o calor envolvido na reação bioquímica. A maior parte do calor em reações enzimáticas é perdida para o meio sem ser detectada (WAN et al., 2013).

#### **1.5.4. Características estruturais das imunoglobulinas**

As moléculas proteicas são caracterizadas pela multiplicidade de funções biológicas. Como por exemplo, as enzimas que atuam na catálise de processos bioquímicos, agindo em moléculas específicas denominadas substratos (XIA, 2013). Outra molécula de relevante função biológica e que semelhantemente as enzimas reconhecem com extremas especificidades, os anticorpos são os anticorpos (RAMARAJ, 2012).

Estas macromoléculas são glicoproteínas, normalmente produzidas por plasmócitos em resposta a um imunógeno e que atuam biologicamente na neutralização ou marcação de moléculas para serem eliminados ou combatidos por mecanismos efetores. Como as proteínas que compõem o plasma sanguíneo podem ser classificadas segundo sua solubilidade ou com base em suas propriedades de migração em um campo elétrico, o termo imunoglobulinas refere-se ao fato de que na migração em um campo elétrico, isto é, na eletroforese, estas proteínas se agrupam entre as globulinas. Consequentemente utiliza-se o termo gamaglobulinas para enfatizar que estas macromoléculas fazem parte de um terceiro grupo de globulinas de migração rápida, e o termo imunoglobulinas ou anticorpo faz referência a função imunitária desta fração proteica (BARCLAY, 2013).

A estrutura de um anticorpo é composta por quatro cadeias polipeptídicas, das quais duas cadeias são leves (L) e idênticas entre si, e duas cadeias pesadas (H) também idênticas. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas apresentam várias unidades homólogas que se repetem ao longo do polipeptídeo, estas unidades homólogas repetitivas são compostas por cerca de 110 aminoácidos que se dobram independentemente em uma estrutura globular denominada domínio da IG. Cada domínio da IG compõe-se de duas camadas de folhas beta pregueadas antiparalelas. A interação das duas camadas antiparalelas é determinada por uma ponte dissulfeto, e as cadeias adjacentes conectadas por alças curtas (BARCLAY, 2013). Todas as moléculas proteicas que apresentam este padrão estrutural, presença de um ou mais domínios de IG, são membros da superfamília de IGs. Foi demonstrado que os polipeptídeos constituintes das moléculas de imunoglobulina são compostas por uma região aminoterminal altamente variável (região variável) e uma região carboxiterminal (região constante). A região variável (V) é responsável pelo reconhecimento antigênico.

Estas regiões são denominadas regiões determinadas por complementaridade (CDR, do inglês complementarity - determining regions). A região constante (C) é responsável por uma variedade de funções efetora (XIA, 2013; RAMARAJ, 2012). A região V das cadeias pesadas é composta por um domínio Ig enquanto que a região C é composta de três ou quatro regiões Ig. Cada cadeia leve é composta de um domínio Ig na Região V e de um domínio Ig na região C. O local de conexão de antígenos é formada pela justaposição da região V de uma cadeia pesada (VH) com a região V de uma cadeia leve (VL). Pelo fato de cada molécula de anticorpo conter duas cadeias pesadas e duas cadeias leves em sua estrutura, ela apresenta dois locais de ligação de antígenos. Os domínios da região C não participam no reconhecimento de antígeno uma vez que são separados do local de associação de antígenos. Cada cadeia leve tem aproximadamente 24 KDa, enquanto cada cadeia pesada tem de 55 a 70 KDa. As cadeias leves e pesadas são interligadas covalentemente por pontes dissulfeto estabelecidas entre resíduos de cisteínas na carboxila terminal da cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada (XIA, 2013; RAMARAJ, 2012).

Interações de natureza não covalentes também podem contribuir para a associação de cadeias pesadas e leve entre os domínios VL e VH e entre os domínios CL e CH1. Em cada molécula de anticorpo, as duas cadeias pesadas são também ligadas covalentemente por ligações dissulfeto. A maior parte das diferenças nas sequências de aminoácidos entre os diversos tipos de anticorpos se estabelece em três locais das regiões V das cadeias pesadas e leves. Essas pequenas extensões são chamadas de segmentos hipervariáveis. As regiões são mantidas no lugar por uma estrutura com sequência de aminoácidos mais conservada, que forma o domínio Ig na região V. A superfície tridimensional de ligação de antígenos é constituída pela aproximação das três regiões hipervariáveis do domínio VL e do domínio VH. Como essas regiões formam uma estrutura que é complementar a estrutura tridimensional do antígeno ligado, as regiões hipervariáveis também são denominadas de regiões determinante de complementariedade (BARCLAY, 2013).

Um antígeno é uma molécula que se liga especificamente a um anticorpo ou a um receptor de antígenos da célula T. Os anticorpos têm a capacidade de reconhecer como antígenos praticamente qualquer tipo de molécula

biológica, como metabólitos intermediários, monossacarídeos, lipídeos, autacóides e hormônios, incluindo as macromoléculas como carboidratos complexos, fosfolipídios, ácidos nucleicos, e proteínas. Como as macromoléculas proteicas, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos, são geralmente muito maiores do que a região de ligação de antígeno de um anticorpo, o anticorpo se liga apenas a uma parte da macromolécula, que é chamada de determinante ou epítopo (HASANZADEH, 2013). Geralmente as macromoléculas contêm em sua estrutura vários determinantes, alguns dos quais podem se repetir e outros podem ser ligados por um antígeno. Quando uma macromolécula apresenta vários determinantes idênticos diz-se que esta possui polivalência ou multivalência. A maioria das proteínas globulares não apresentam multiplicidade de epítopos e consequentemente não são polivalentes, a não ser que se encontrem sob a forma de agregados. Nos polissacarídeos e nos ácidos nucleicos pode haver muitos epítopos idênticos distanciados entre si, portanto são polivalentes. Quando os determinantes estão muito separados, duas ou três moléculas de anticorpos, podem se ligar ao mesmo antígeno proteico sem influenciar umas às outras, ou seja, os determinantes não estão sobrepostos (BARCLAY, XIA, 2013). Quando dois determinantes estão muito próximos, a conexão de um anticorpo ao primeiro anticorpo pode interferir espacialmente na ligação do segundo anticorpo pelo fato dos determinantes estarem sobrepostos. Existem casos mais raros onde a conexão do primeiro anticorpo pode determinar uma mudança conformacional na estrutura do antígeno, influenciando de maneira positiva ou negativa a conexão do segundo anticorpo em outro local na proteína por outros modos que não a interferência em sua configuração espacial. Tais interações são chamadas de efeitos alostéricos (XIA, 2013). Qualquer tipo de composto pode ser um determinante antigênico passível de ser reconhecido, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos sendo que esta capacidade não restringe a estas moléculas. Nas proteínas, a formação de determinantes depende somente de sua estrutura primária, enquanto a formação de outros determinantes depende de sua estrutura terciária. Epítopos formados por vários aminoácidos adjacentes são chamados de determinantes lineares. O local de reconhecimento de antígenos de um anticorpo pode geralmente acomodar um determinante linear composto de aproximadamente seis aminoácidos. Quando os

determinantes lineares se expõem na superfície externa ou em uma região de conformação longa na proteína nativa dobrada, eles são facilmente mais acessíveis a anticorpos. Geralmente os determinantes lineares podem ser inacessíveis na conformação nativa e aparecer somente quando a proteína é desnaturada. Em contraste, determinantes conformacionais são formados por aminoácidos que não estão em sequência mas se tornam espacialmente justapostos em consequência do dobramento espacial da proteína (RAMARAJ, 2012).

#### **1.5.5. Bases Químicas da Interação Antígeno/Anticorpo**

Os locais de ligação de antígenos da maioria dos anticorpos são superfícies planas que podem acomodar epítomos conformativos de macromoléculas, permitindo que os anticorpos se liguem a moléculas grandes (BARCLAY, 2013). Essa é uma diferença muito importante entre os locais de ligações de antígenos das moléculas de anticorpos. O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo envolve uma ligação não covalente reversível. Vários tipos de ligações não-covalentes podem contribuir com a ligação do antígeno pelo anticorpo, incluindo forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Wals e interações hidrofóbicas. A importância relativa de cada uma delas depende da estrutura dos locais de ligação de cada anticorpo e do determinante antigênico. A força da ligação entre um único local de ligação de um anticorpo e um epítopo de um antígeno é chamada de afinidade do anticorpo. A afinidade é normalmente representada por uma constante de dissociação ( $K_d$ ), que indica a facilidade com a qual se pode separar um complexo antígeno-anticorpo nos seus constituintes (RAMARAJ, 2012; XIA, 2013).

Uma constante de dissociação ( $K_d$ ) menor indica uma interação mais forte ou mais alta afinidade porque uma concentração mais baixa de antígeno e de anticorpo é necessária para a formação de complexos. Se um antígeno polivalente é misturado com um anticorpo específico em um tubo de ensaio, os dois interagem para formar complexos imunes (BARCLAY, 2013). Na concentração certa, chamada de zona de equivalência, o antígeno e o anticorpo formam uma extensa rede de moléculas unidas por ligações cruzadas de forma que a maioria ou todas as moléculas de antígeno e anticorpo estão unidas em complexas



massas de grandes proporções. Os complexos imunes podem se dissociar em agregados menores aumentando-se a concentração de antígenos de modo que moléculas de antígenos livres deslocarão os anticorpos ligados aos determinantes antigênicos (zona de excesso de antígeno) ou aumentando-se a quantidade de anticorpo de modo que as moléculas de anticorpo livres deslocarão os anticorpos ligados aos determinantes antigênicos (XIA, 2013; RAMARAJ, 2012).

#### **1.5.6. Técnicas de Imobilização de Anticorpos**

Este processo é fundamental para a construção de um imunossensor eletroquímico uma vez que as propriedades de reconhecimento específico da biomolécula são exploradas. Esta fixação ocorre sobre o eletrodo, ou seja no transdutor. Este por sua vez pode ser feito a partir de metais, como ouro, platina ou de materiais caracteristicamente semicondutores como óxido de estanho, grafite, carbono vítreo e pasta de carbono (GOPINATH, 2014, SUPRUN et al., 2014, ORAZIO, 2011). As estratégias para a imobilização de biomoléculas sobre a superfície do transdutor estão descritas a seguir.

#### **1.6. Adsorção**

Este tipo de imobilização utiliza como força atrativa de fixação, interações não covalentes, isto é, interações relativamente fracas como ligações iônicas, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Uma possível desvantagem é que em alguns casos, a imobilização física determina fixação fraca e orientação aleatória. Por consequência disto, uma estratégia muito é o aprisionamento da proteína sobre em uma matriz polimérica (GOPINATH, 2014).

##### **1.7.1. Ligação covalente**

Nas ligações químicas covalentes, os elementos estão compartilhando elétrons. Para se desfazer este tipo de interação é necessária a aplicação de uma quantidade relevante de energia, por consequência, apresentam maior estabilidade quando comparadas as interações Interatômicas/intermoleculares de outra natureza. Na imobilização de moléculas proteicas sobre eletrodos, a ligação geralmente se estabelece por grupos funcionais expostos a partir das cadeias

laterais dos aminoácidos constituintes da biomolécula (XIA, 2013). Para que a fixação de moléculas de imunoglobulinas seja otimizada, pode-se modificar eletroquimicamente a superfície do eletrodo, resultando em grupos carboxi passíveis de interagir com os grupos aminas da macromolécula proteica.

### **1.7.2. Ligação covalente cruzada**

Outra abordagem é a utilização de compostos orgânicos bifuncionais que estabelecem ligações cruzadas como o glutaraldeído, cistamina (HASANZADEH et al., 2013). A ativação eletroquímica de eletrodos de carbono é uma estratégia que também pode ser usada na construção de imunossensores eletroquímicos. Como a região de reconhecimento de antígeno está vinculada a estrutura tridimensional do segmento hipervariável, que constitui a região determinante da complementariedade anticorpo-antígeno, é importante que a molécula esteja com uma orientação favorável sobre a plataforma de imobilização (SUPRUN et al., 2014). De fato, em alguns casos, a imobilização pode resultar em perda total ou parcial da atividade bioquímica por consequência da aleatoriedade da orientação espacial pós-fixação. Na imobilização orientada a sonda de captura do alvo são imobilizadas de tal forma que os sítios de reconhecimento estão expostos, uniformemente dispostos para ligação com o alvo presente na amostra avaliada (GOPINATH, 2014).

### **1.7.3. Oclusão**

Neste sistema ocorre o aprisionamento de uma biomolécula em uma rede polimérica como um polímero orgânico, onde a proteína fica confinada nesta rede.

A vantagem desta técnica é que a biomolécula não interage quimicamente com o polímero, evitando a desnaturação. Entretanto, o método possui como desvantagem a diminuição da velocidade dos substratos e produtos através da membrana polimérica (MATEO et al., 2007)

## **Referências Bibliográficas**

AURÉLIO, M. et al. Cardiovascular risk factors and evidence-based health Education. **Health**, v.6, p. 625-631, 2014.

MESIA, M. et al. Mechanism of cardiovascular remodeling in hiperhomocysteinemia. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15,n.7,p.1927-1943, 2011.

JAVIER, S. et al. The Year in atherothrombosis. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 62, n.13, p.1131-1143, 2013.

KAMPOLI,A.-M.et al. Biomarkers of premature atherosclerosis. **Trends in molecular medicine**, v.15, n. 7, p 323-332, 2009.

WAKE, W. et al. Cardiac computed tomography of the diagnosis of coronary artery atherosclerosis. **International jornal of clinical medicine**, v. 4, p.183-189, 2013.

MONTENEGRO, et al. **Patologia Processos Gerais**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p.331, 2010.

VITIELLO, L. et al. Microvascular inflammation in atherosclerosis. **IJC metabolic & endocrine**, p. 1-7, 2014.

BERAIA, M. Arterial pulse impacto on blod flow. **Health**, v.2, p. 532-540, 2010.

MICHAEL, A. et al. Esleep duration, cardiovascular disease, and proinflammatory biomarkers. **Nature and Science of sleep**, p. 93-107, 2013.

STONER, L. et al . Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. **Clinical biochemistry**, v. 45, n .15, p. 1353-1371, 2013.

MOORE, K.J e TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-355, 2011.

MILLER, O.et al. **Laboratório para o clínico**. 8ª ed. São Paulo : Atheneu, p-55-65, 2007.

PIETRUCHA, A. et al. The influence of obesity on progression of coronary arteriosclerosis and clinical course after ST elevation acute myocardial infarction treated with primary coronary interventions. **Advances in medical sciences**, v.5, p. 241-248, 2011.

DANA, H. et al. Serum lipids and neopterin in urine as new biomarkers of malnutrition and inflammation in the elderly. **Nutrition**, v. 25, p. 303-308, 2009.

SOFIA, M. et al. The role of oxidative stress in alterations of hematological parameters and inflammatory markers induced by early hypercholesterolemia. **Lifes sciences**, v. 93, p. 503-508, 2013.

TERRY, W. e CLOS, D. Pentraxins: estrutura,function,and role in inflammation. **ISRN Inflammation**, p. 1-23, 2013.

WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic acids research**, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, set 2007.

RAMARAJ, T.et al. Antigen-antibody interface properties: composition, residue interaction, and features of 53 non-redundant structures. **Proteins and proteomics**, v. 1824, p.520-532, 2012.

GOPINATH,S. et al. Current aspects in immunosensors. **Biosensor and bioelectronics**, v.57, p. 292-302, 2014.

VESTERGAAD. M.; KERMAN. K.; TAMIYA. E. An overview of Label-free electrochemical protein sensor. **Sensors**. v.7, p. 3442-3458, 2007.

BARCLAY, A. Immunoglobulin superfamily. **Elsevier**, v.2, p. 998-999, 2013.

WAN, Y.et al..Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, p.1–11, 2013.

XIA,Y. The constant region affects antigen binding of antibodies to DNA by altering secondary structure. **Molecular immunology**, v.56, p. 28-37, 2013

SUPRUN, E. et al. Protein electromemistry: aplication in medicine. **Electrochimica acta**, p.1-11, 2014.

HASANZADEH, M. et al. Electrochemical nano-immunosensing of effective cardiac biomarkers for acute myocardial infarction.**Treends in analytical chemistry**, v. 49, p. 20-30, 2013.

ORAZIO,P. Biosensors in clinica chemistry. **Clinica chimica acta**,v.412,p. 1749-1761, 2011.

GRAVRILIDOU, D.; BRIDLE, H. Comparison of immobilization strategies for Cryptosporidium parum immunosensors. **Biochemical engineering jornal**, v. 68, p. 231-235, 2012.

RICCI, F. et al. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica acta**, v. 84, p. 74- 83, 2012.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

## **Capítulo II: Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C Reativa**

## RESUMO

Foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico para detecção de proteína c reativa, um biomarcador de doenças cardiovasculares, especificamente a aterosclerose. Para tal utilizou-se um eletrodo de grafite modificado com poli (3-aminotiofenol), um anticorpo específico e o composto 4-aminoantipirina (4-AAP) como intercalante, o qual foi aplicado nas detecções indiretas. O imunossensor desenvolvido mostrou-se eficaz na detecção de proteína c reativa, um biomarcador de aterosclerose. O limite de detecção obtido foi de  $75 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $N = 3$ ), apresentando seletividade e especificidade eficaz na detecção deste alvo. Desta forma este sistema mostra-se relevante como uma ferramenta no diagnóstico precoce de aterosclerose.

Palavras-chave: aterosclerose, 4-aminoantipirina, imunossensor, poli(3-aminotiofenol)

## Development of an immunosensor based on a graphite electrode modified by poly 3-aminothiophenol for the detection of C-reactive protein

Anderson J. G. Lemos<sup>1</sup>, Renata P. A. Balvedi<sup>1</sup>, Vinicius R. Rodovalho<sup>1</sup>, Laise O. Resende<sup>2</sup>, João M. Madurro<sup>3</sup> and Ana G. Brito-Madurro <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil;

2. Faculty of Biomedical Engineering, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil;

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

\*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203;

Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

### Abstract

This paper describes the development of immunosensor for C reactive protein (CRP), based in direct and indirect electrochemical detections. The anti-CRP probe was grafted to the platform sensitized with poly(3-aminothiophenol), and the interaction of CRP target with the immunosensor was carried directly or indirectly, using 4-aminoantipyrine (4-APP) as indicator. The immunosensor presents a linear response in the range from 75 ng·mL<sup>-1</sup> to 150 µg·mL<sup>-1</sup> and detection limit of 75ng·mL<sup>-1</sup> (N=3). The biosensor specificity determined in the presence of non-specific target is also presented in this paper. Assays realized in real samples indicate that the immunosensor discriminates the serum samples from healthy and sick patients with efficiency. In addition, through atomic force microscopy, it was possible to observe differences between the immunosensor surface in the absence or presence of the CRP target.

**Keywords:** Biosensors, C reactive protein; cardiovascular diseases; antigen-antibody recognition.

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases are the leading causes of morbidity and mortality worldwide [1-2]. This group of diseases is characterized by dysfunction in the veins, arteries and heart, and a high risk of development is associated with a family history of the individual, sex, age, smoking, hyperglycemia, obesity, hypertension, physical inactivity and high cholesterol in the blood plasma [3]. Among cardiovascular diseases, the process of formation of atherosclerosis calls attention to the fact develop silently throughout the life of an individual, and may induce ischemia of the heart, brain or extremities, resulting in heart attack[4]. The C-reactive protein (CRP) is an acute-phase protein and has been identified as biomarker for atherosclerosis and inflammatory process [5], since the concentration of these biomarker increases in plasma of patients with these processes [6]. CRP is usually detected in clinical laboratories by immunoturbidimetry and immunonefelometry, using polyclonal antibodies. However, these techniques require highly skilled personnel and use of expensive instrumentation [7].

For many decades the antibodies has been identified as ideal for the development of electroanalytical systems for detection of specific biomolecules [8]. These devices, called electrochemical immunosensors has attracted interest because of their numerous advantages over other detection systems, such as high sensitivity, ease of use, possibility of automation and integration into compact analytical devices, presenting low cost and relatively simple technology [9]. Due to their characteristics, these devices have shown to be very promising for clinical application [10]. Considering that the antibodies are asymmetric molecules and their recognition sites should be available to interact with your target, numerous strategies have been adopted for probe immobilization onto transducer surface [11-19].



The use of polymeric films in the functionalization of electrodes has been studied, being the modified electrodes produced applicable in the development of immunosensors [20].

Recently, our research group reported the preparation of electrodes coated with conducting polymer films [21-22]. The results showed that these polymers prepared in acid medium show interesting properties, such as good stability and electrical conductivity. Among the monomers studied, aminothiophenol showed advantageous in the modification of electrodes, since the resultant polymer has functional groups that can interact with probe biomolecules for detection of biomarkers [21]

This paper reports the development of an immunosensor for detection of c-reactive protein in human biological fluid, applied in the diagnosis of inflammatory processes and cardiovascular diseases.

## **2. Experimental**

### **2.1. Materials and reagents**

The solutions were prepared using deionized water (Master System, Gehaka Brazil). The Solution of 2.5 mol.L<sup>-1</sup> 3-aminothiophenol (Acros Organics) was prepared in ethyl alcohol (PA) and 0.5 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. All solutions and reagents were prepared at room temperature (about 25°C ± 1 °C). 0.1 mol.L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution was prepared at pH 7.4. Anti-CRP monoclonal antibody and CRP antigen were obtained from Sigma-Aldrich. Stock solutions of these biomolecules were prepared in phosphate buffer. The indicator 4-aminoantipyrine (4-AAP) was obtained from Sigma-Aldrich.

### **2.2. Apparatus**

All electrochemical measurements were carried out using a potentiostat (CH Instruments, model 420A). A system of three electrodes was used, including a carbon working electrode, Ag/AgCl reference electrode and a platinum auxiliary electrode. Film morphology in absence or presence of biomolecules was assessed by atomic force microscopy (AFM, Shimadzu, model SPM 9600, tapping mode).

### 2.3. Electrochemical polymerization of 3-aminothiophenol

Prior to electropolymerization, the bare graphite electrode was mechanically polished with alumina (0.3  $\mu\text{m}$ ) slurry, ultrasonicated, washed with deionized water and dried in the air. 3-aminothiophenol solution was deaerated with ultra pure nitrogen for ca. 45 minutes, prior to electropolymerization. The monomer 3-aminothiophenol (3-ATP) was electropolymerized onto graphite electrode through continuous cycling of the potential, -0.4 V to +1.0V, 50  $\text{mV.s}^{-1}$ .

### 2.4. Anti-CRP immobilization

The anti-CRP immobilization was carried out by dropping of 13  $\mu\text{L}$  of anti-CRP (25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) onto the modified electrodes with poly(3-ATP), and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes. The electrode was immersed for 30 s in water and after in 0.5% (w/v) BSA solution (Bovine Serum Albumin) overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ . Then, the electrode was washed in phosphate buffer and dried with  $\text{N}_2$ .

### 2.5. Detection of the interaction anti-CRP:CRP

After the immobilization of the anti-CRP probe, the modified electrodes were washed in phosphate buffer and dried in  $\text{N}_2$ . After, 26  $\mu\text{L}$  of different concentrations of CRP target (0.075  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 7.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were applied on the modified electrodes and maintained for 40 minutes at 37  $^{\circ}\text{C}$ , washed in phosphate buffer and dried in  $\text{N}_2$ .

To detection, 4-APP (10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 18  $\mu\text{L}$ ) was added on the modified electrode surface and maintained for 10 minutes at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Another step of rinsing was carried out by immersion in phosphate buffer.

### 2.6. Analysis of serum using the immunosensor

Serum samples from healthy and sick patients (three samples of each) were collected from the Hospital of Clinics of the Federal University of Uberlândia (Uberlândia, MG - Brazil). These samples (undiluted, 26  $\mu\text{L}$ ) were added on the surface of the immunosensor during 40 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$ . After, this platform was washed in phosphate buffer and dried in  $\text{N}_2$ . For detection, 4-APP (10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 18  $\mu\text{L}$ ) was added onto the modified electrodes containing anti-CRP and maintained

for 40 minutes at 37°C. Another step of rinsing was carried out by immersion in phosphate buffer during 5 seconds.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Electrochemical behavior of 3-aminothiophenol

Figure 1 shows the cyclic voltammetric behavior of 3-aminothiophenol as function of continuous potential scanning and the characterization in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. It is demonstrated that the electrochemical response of the chemically modified electrode has a conductance characteristic profile, with a greater current density compared with the graphite electrode without surface modification.

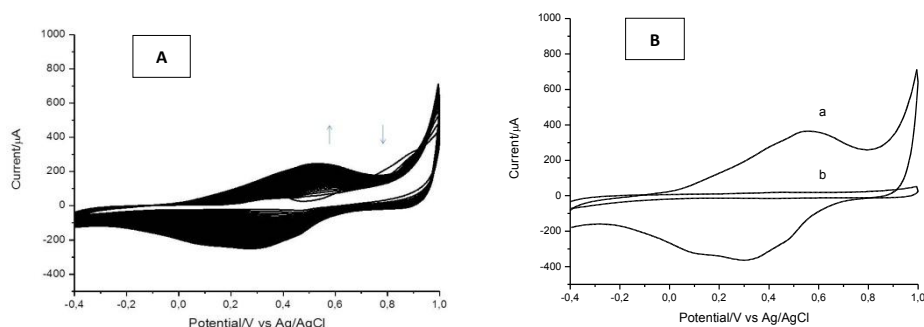
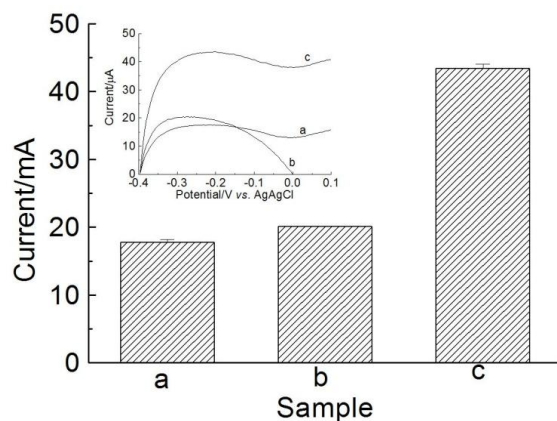


Figure 1. (A) Cyclic voltammograms of graphite electrode in solution of 3-aminothiophenol (2.5 mmol.L<sup>-1</sup>) at pH 0.5; 50 mV.s<sup>-1</sup>, 100 scans. The arrows indicate a increase in the number of scans. (B) Cyclic voltammograms of bare graphite electrode (a) and graphite electrode functionalized with poly (3-ATP) (b). Supporting electrolyte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 mol.L<sup>-1</sup>; Scan rate: 50 mV.s<sup>-1</sup>.

#### 3.2. Immobilization and detection of the CRP target

One way to demonstrate the incorporation of biomolecules on the transducer surface is through studies using electroactive complexes such as mediators [22-24]. In order to evaluate the antibody probe and specific or non-specific target detection, cyclic voltammetry technique was employed, using the 4-aminoantipyrine as indicator of this immobilization and recognizing of the target (Fig. 2), based on its electrochemical activity [26-27] and through van der Waals

forces and hydrogen bonds [25]. The incubation time of the probe with the target was studied, being the best current response obtained at 40 min. This time was maintained in the experiments of detection.



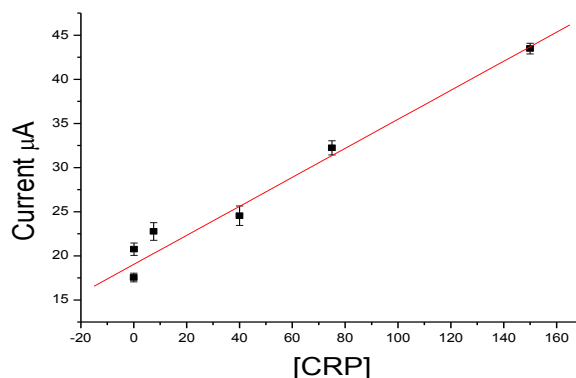
**Figure 2.** Differential pulse voltammograms of 4-aminoantipyrine ( $10 \text{ mol.L}^{-1}$ ) on graphite electrode modified with poly(3-ATP) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing anti-CRP ( $150 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) before interaction (a) and after interaction with: non-specific target, anti-CA125 ( $26 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (b) and specific target, (CRP,  $26 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (d). Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s;  $20 \text{ mVs}^{-1}$ . Inset: Bar chart of differential pulse voltammograms responses using the oxidation signal from 4-APP.

It was observed an increase in the current signal amplitude (Fig 2c) when compared with the immunosensor in the absence of the target (Fig 2a). These response is caused by interaction between anti-CRP (probe):CRP(target), where occurs increase in the quantity of amino acids able to interact with 4-AAP (Figure 2). 4-Aminoantipyrine is a metabolite of aminophenazone, containing an aromatic amino group in its structure, suggesting interaction by van der Waals forces, mainly due to presence of aromatic amino acids residues (histidine, phenylalanine, tryptofan and tyrosine), as well as through hydrogen bonds of amino group with polar amide carbonyl groups present in biomolecules CRP and anti-CRP. The interaction of 4-APP with other biomolecule (bovine hemoglobin) through van der Waals forces and hydrogen bonds was reported by Teng and collaborators [25].

The immunosensor specificity was investigated using a non specific antigen (CA-125) (Fig. 2b). The results showed an increase in the amplitude of the current signal of 4-APP, in presence of anti-CRP target. The electrochemical detection presents a ratio of 2.5 between the signal of the specific probe and the signal of the immunosensor and 1.1 for the non specific target (anti CA-125), indicating that the system discriminates the CRP target with high efficiency.

### 3.3. Analytical performance of the immunosensor

The Fig. 3 shows the response of the immunosensor with the increase of the CRP concentrations.



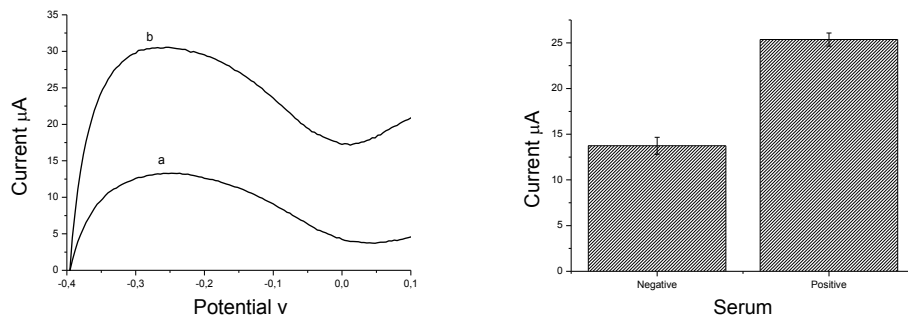
**Figure 3.** Calibration curve obtained for CRP using the oxidation signal of 4-APP obtained after the recognition of modified electrode containing the probe anti-CRP with different concentrations of CRP target (0.075  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 7.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

The obtained results showed a linear relationship between the peak currents and the concentration of CRP target in the range of 0.075  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  to 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , with a correlation coefficient of 0.9916. The linear regression equation was  $\Delta I = 18.85 + 0.16443[\text{CRP}]$  and the detection limit obtained was 7.24  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  or 0.724 mg/dL (N=3).

CRP levels in the blood above 1 mg/dL indicate inflammatory and infectious disorders, being compatible with the linear range of the immunosensor proposed in this study (0.0075 mg/dL to 75 mg/dL<sup>-1</sup>), presenting the advantage of using low blood volume [28].

### 3.4. Measuring of CRP target in human serum sample

To evaluate the effectiveness of the immunosensor for detection of CRP in biological samples, positive and negative serum of individual patients for inflammatory diseases were tested (Figure 4).

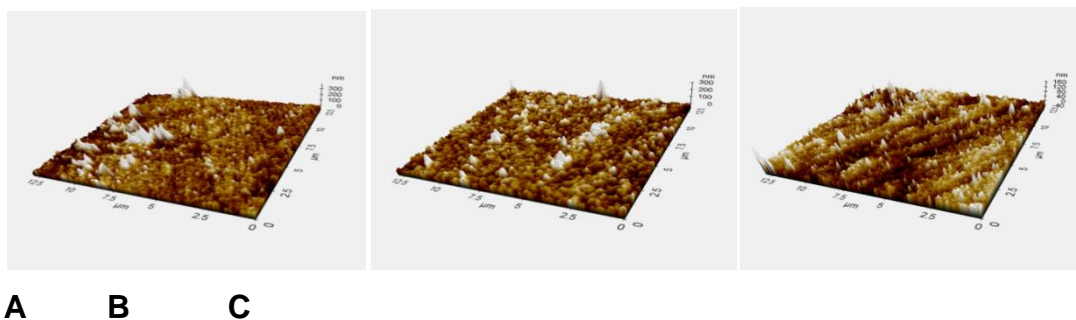


**Figure 4.** Differential pulse voltammograms of 4-aminoantipyrine onto graphite electrode modified with poly(3-ATP)/anti-CRP in negative serum (a) or positive serum for the CRP (b). Bar chart of current vs. sample (N=3).

In serum sample in pathological conditions it was observed an increase of the 50% in the current response in relation to non-pathological conditions, indicating that the biosensor can discriminate the increase in CRP concentration in real samples. The development system is advantageous, since that the samples did not require any pre-treatment before analysis.

### 3.5. Morphological characterization of the immunosensor using atomic force microscopy

In addition to electrochemical studies, morphological evaluations of the surfaces were performed using atomic force microscopy (Figure 5).



**Figure 5.** Atomic force microscopy (AFM) images of (A) graphite/poly(3-ATP); (B) graphite/poly(3-ATP)/anti-CRP; and (C) graphite/poly(3-ATP)/anti-CRP/CRP.

AFM images to poly(3-ATP) without biomolecules (Fig. 5A), after immobilization of the anti-CRP (probe, Fig. 5B) and after incubation with the CRP (target, Fig. 5C) indicates that occurs attachment of antibody molecules onto polymer and the interaction anti-CRP:CRP. The roughness values obtained were:  $80.2 \pm 2.16$  nm (modified electrode with polymer),  $48.3 \pm 1.39$  nm (polymer/anti-CRP),  $49.23 \pm 0.97$  nm (polymer/anti-CRP:CRP).

The comparison between the surfaces of the graphite electrode modified with poly(3-aminotiophenol) before (Fig. 5A) and after immobilization of the anti-CRP (Fig. 5B) shows significant change in surface, being observed formation of numerous clusters and decrease in roughness value, indicating that the anti-CRP was incorporated on the modified graphite electrode, in accordance with the voltammetric studies (see Fig.2). After recognize the CRP-target by immunosensor, the surface becomes more rougher, indicating that it is able to recognize the biological target.

#### 4. Conclusions

The novel strategy for constructing an immunosensor based on the poly(3-ATP)/anti-CRP using 4-aminoantipyrine as indicator was proposed. The results showed that functionalized surfaces with poly(3-ATP) are interesting platforms for the development of a immunosensor. The produced immunosensor shows interesting properties, such as good selectivity and sensibility. This is a promising technique of molecular analysis of a specific biomarker for CRP in human serum.

## Acknowledgments

The authors are grateful for financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES).

## References

- [1] Steed, M. M., & Tyagi, S. C. (2011). Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1927–43. doi:10.1089/ars.2010.3721.
- [2] Diseases, C., & Region, M. (2011). Artigo Original Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo : Atualização 2011.
- [3] Vitiello, L., Spoletini, I., Gorini, S., Pontecorvo, L., Ferrari, D., Ferraro, E., Caprio, M. (2014). IJC Metabolic & Endocrine Microvascular in inflammation in atherosclerosis. doi:10.1016/j.ijcme.2014.03.002.
- [4] Beraia, M. (2010). Arterial pulse impact on blood flow. *Health*, 2(6), 532–540. doi:10.4236/health.2010.26080.
- [5] Du Clos, T. W. (2013). Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. *ISRN Inflammation*, 2013, 379040. doi:10.1155/2013/379040.
- [6] Stoner, L., Lucero, A. a, Palmer, B. R., Jones, L. M., Young, J. M., & Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*, 46(15), 1353–71. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.070.
- [7] Kuswandi, B. et al. A simple visual ethanol biosensor based on alcohol oxidase immobilized onto polyaniline film for halal verification of fermented



beverage. *Sensors (based)*, 14 (2), 2135-49. doi:0.3390/s140202131.2014 jan.

[8] Gopinath, S. C. B., Tang, T.-H., Citartan, M., Chen, Y., & Lakshmipriya, T. (2014). Current aspects in immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 57, 292–302. doi:10.1016/j.bios.2014.02.029.

[9] Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G., & Fan, C. (2013). Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics*, 47, 1–11. doi:10.1016/j.bios.2013.02.045.

[10] D’Orazio, P. (2011). Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(19-20), 1749–61. doi:10.1016/j.cca.2011.06.025.

[11] Makaraviciute, A., & Ramanaviciene, A. (2013). Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 50, 460–71. doi:10.1016/j.bios.2013.06.060.

[12] Ricci, F., Adornetto, G., & Palleschi, G. (2012). A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 84, 74–83. doi:10.1016/j.electacta.2012.06.033.

[13] Ramaraj, T., Angel, T., Dratz, E. a, Jesaitis, A. J., & Mumey, B. (2012). Antigen-antibody interface properties: composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(3), 520–32. doi:10.1016/j.bbapap.2011.12.007.

[14] Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1887–92. doi:10.1016/j.bios.2005.10.027.

[15] Saftics, A., Agócs, E., Fodor, B., Patkó, D., Petrik, P., Kolari, K., Kurunczi, S. (2013). Investigation of thin polymer layers for biosensor applications. *Applied Surface Science*, 281, 66–72. doi:10.1016/j.apsusc.2012.12.042.

- [16] Shen, G., Cai, C., Wang, K., & Lu, J. (2011). Improvement of antibody immobilization using hyperbranched polymer and protein A. *Analytical Biochemistry*, 409(1), 22–7. doi:10.1016/j.ab.2010.09.028.
- [17] Grinenvall. Nonglaton,G.; Vinet,F. Spatially controlled immobilisation of biomolecules: A complete approach in green chemistry. *Applied Surface Science*, 289,571-580.2014.
- [18] Pimenta-Martins, M. G. R., Furtado, R. F., Heneine, L. G. D., Dias, R. S., Borges, M. D. F., & Alves, C. R. (2012). Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 138–43. doi:10.1016/j.mimet.2012.05.016.
- [19] Peluso, P., Wilson, D. S., Do, D., Tran, H., Venkatasubbaiah, M., Quincy, D., Nock, S. (2003). Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Analytical Biochemistry*, 312(2), 113–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531195>.
- [20] Wenbo, L., Xiaowei, C., Lin, T., Juan, G., Jian, D., Weiping, A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on Ag nanoparticle decorated infinite coordination polymer fibers. *Biosensors and Bioelectronics* ,57 (15),219-225.July 2014.
- [21] Balvedi, R.P.A.,Castro, A.C.H.;Madurro, J.M.; Brito-Madurro, A. G. Detection of a specific biomarker for Epstein-barr virus using a polymer-based genosensor. *International Journal of Molecular Sciences*,15, 9051-9066.2014.
- [22] Jamal, M. O., Worsfold, T.,Dempsey, E,M. A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase (ALT),*Biosensors and Bioelectronics*,24,2926.2009.

- [23] Song, M. J., Yun, N.K., Min, S. I. Electrochemical array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, (32).2007
- [24] Suman, S., Singhal, R., Sharma, A.L., Malthotra, B.D., Pundir, C.S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactase oxidase. *Sens. Actuators B*, 107, 768. 2005
- [25] Teng, Y., Liu., R., Yan, S., Pan, X., Zhang, P., Wang, M. Spectroscopic investigation on the toxicological interactions of aminoantipyrine with bovine hemoglobin. *J. fluoresce* (20), 381-387. 2010.
- [26] Hu, X., Yang, J., Yang, C., Zhang, J. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation of 4-aminoantipyrine: a voltammetric study. *Chemical Engineering journal*, 161 (2010), 68-72.
- [27] Rodrigues, L. P., Ferreira, L. F., Monte, A. F. G. Do, Brito-Madurro, A. G., & Madurro, J. M. (2014). Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(9), 6528–6538. doi:10.1166/jnn.2014.9369.
- [28] Paul, M., Cushman, M., Meier J., Stampfer, J., Russel, P., Charles, H. Plasma concentration of c-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 97, 425-428. 1998.