



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

**Biosensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G:
uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil**

Aluno: Vinícius de Rezende Rodovalho

Orientador: Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA – MG

2016



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

**Biosensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G:
uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil**

Aluno: Vinícius de Rezende Rodovalho

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

2016

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

R695b Rodovalho, Vinícius de Rezende, 1992
2016 Biosensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G: uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil / Vinícius de Rezende Rodovalho. - 2016.
81 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. Genética e bioquímica - Teses. 2. Biosensores - Teses. 3. Eletrodos - Teses. 4. Peptídeo - Teses. 5. Artrite idiopática juvenil - Teses. I. Brito-Madurro, Ana Graci. II. Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



**Biosensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G:
uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil**

ALUNO: Vinícius de Rezende Rodovalho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dr.^a Ana Graci Brito Madurro
(Orientadora)

Examinadores:

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Data da Defesa: 29/07/2016

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

Ana Graci Brito Madurro

“Há que não atentar muito em felicidades, graças, bem-aventuranças distantes e desconhecidas, mas sim em viver da maneira com que gostaríamos de reviver, dentro dos mesmos moldes, até à eternidade. É esta a tarefa que temos pela frente: constante e continuadamente”.

(Friedrich Nietzsche)

Agradecimentos

Agradeço:

Aos meus pais e meu irmão, que ouviram minhas comemorações, reclamações, alegrias e tristezas, sempre presentes como o alicerce fundamental.

Aos meus amigos do laboratório, que tornaram a experiência da pesquisa mais agradável, rindo dos experimentos que deram certo, chorando junto quando deram errado, entendendo um pouco mais de ciência e humanidade a cada dia: Dani, Lívia, Zé, Lucas, Heliane, Sandro, Rafael, Priscila, Laíse, Mônica, Jussara, Rafaela, Héden, Fábio, Ana Cristina, Erick, Drielly, Bárbara, João Afonso, Marcos Paulo...

Aos meus amigos da graduação e da vida, que povoaram de alegria os dias mais felizes e trouxeram um pouco de cor para os dias mais escuros: Allisson, Sofia, Euclides, Bianca, Victor, Vilmar, Gabi, Yuri...

Aos nossos parceiros neste projeto, Galber Araújo, Emília Rezende Vaz e professor Carlos Ueira Vieira, responsáveis pelo desenvolvimento da sonda utilizada neste biosensor, sempre acessíveis e prestativos.

Ao Guilherme, pela paciência, solicitude e grande auxílio na aquisição e interpretação das imagens de microscopia de força atômica.

À Janaína, pela paciência e auxílio em todas as questões formais. Aproveito para estender o agradecimento a todos do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB-UFU).

Aos membros da banca, professores Jonny Yokosawa (UFU) e César Augusto Souza de Andrade (UFPE); pela valiosa contribuição para este trabalho.

Aos meus orientadores, Ana Graci Brito Madurro e João Marcos Madurro; pelos conhecimentos compartilhados, pela grande paciência e compreensão.

Aos órgãos de fomento (CNPq, CAPES, FAPEMIG) e à Universidade Federal de Uberlândia, por garantirem as condições (materiais e imateriais) necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

E a você, leitor (a), pelo interesse e disposição em ler as páginas que se seguem.

A todos, o meu muito obrigado!

Nomenclatura

Δi_p – variação de intensidade de corrente de pico

AFM – microscopia de força atômica, de *atomic force microscopy*

BSA – albumina de soro bovino, de *bovine serum albumin*

CA – cronoamperometria

C_{DL} – capacidade da dupla camada, de *double layer capacitance*

CPE – elemento de fase constante, de *constant phase element*

DP_a – desvio-padrão do branco

E – potencial elétrico, unidade: volt (V)

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática, de *enzyme-linked immunosorbent assay*

E_p – potencial de pico

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

FD – fator de diluição

HC – amostra de soro de indivíduos saudáveis, de *healthy control*

i – corrente elétrica, unidade: ampere (A)

i_p – corrente de pico

i_{pa} – corrente de pico anódico

i_{pc} – corrente de pico catódico

IgG – imunoglobulina G

JIA – artrite idiopática juvenil, de *juvenile idiopathic arthritis*, ou a amostra de soro dos pacientes com artrite idiopática juvenil

m – coeficiente angular da reta

pl – ponto isoelétrico

PRF+1 – peptídeo com a sequência “ACSSWLPRGCGGGS”

Q – carga elétrica, unidade: Coulomb (C)

R_{CT} – resistência à transferência de carga, de *charge transfer resistance*

R_q – rugosidade média quadrática

Rs – resistência da solução

SPCE – eletrodos impressos de carbono, de *screen-printed carbon electrodes*

t – tempo, unidade: segundos (s)

VC – voltametria cíclica

VPD – voltametria de pulso diferencial

W – impedância de Warburg

Z' – parte real da impedância

-Z'' – parte imaginária da impedância

Lista de figuras

Figura 1. Esquema representativo de um biossensor. Neste caso, a plataforma de transdução é representada pelo plano cinza e o biocomponente é um anticorpo, capaz de reconhecer um alvo específico presente em uma amostra complexa (Fonte: autoria própria).....	4
Figura 2. Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três compartimentos, com os eletrodos posicionados. São destacadas as regiões de entrada e saída de gás nitrogênio, bem como o capilar de Luggin, que tem a função de aproximar os eletrodos de trabalho e referência (Fonte: autoria própria).....	6
Figura 3. Representação esquemática de um eletrodo impresso comercialmente disponível. Neste eletrodo, o sistema de três eletrodos é integrado e miniaturizado, fortalecendo aspectos propostos para os biossensores, como portabilidade, baixo custo e uso de pequenos volumes de amostra (Fonte: autoria própria)	9
Figura 4. Representação de aminoácidos e peptídeos. A) Fórmula estrutural geral dos aminoácidos, com um carbono- α central ligado a um grupo carboxílico, um grupo amino, um hidrogênio e a cadeia lateral variável (R). B) Representação tridimensional da L-alanina, cuja cadeia lateral é um radical metil (-CH ₃). C) Representação tridimensional de um tripeptídeo composto apenas por resíduos de alanina, destacando as ligações peptídicas com setas. Nas representações tridimensionais, foi utilizado o modelo de esferas e bastões, com átomos de carbono representados em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul (Fonte: autoria própria).	11
Figura 5. Representações gráficas da voltametria cíclica. A) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado de E ₁ a E ₂ , em seguida retornando a E ₁ . B) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar os picos de oxidação e redução. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; E _{pc} : potencial de pico catódico; E _{pa} : potencial de pico anódico; i _{pc} : corrente de pico catódico; i _{pa} : corrente de pico anódico. O delta (Δ) representa a variação de corrente de pico, com a subtração da corrente de pico pela corrente na base do pico (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).	16
Figura 6. Representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. A) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. B) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t _p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico. (Adaptado de SCHOLZ, 2010 e KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).	18
Figura 7. Representações gráficas da cronoamperometria. A) Gráfico de potencial em função do tempo: após uma súbita variação, é aplicado um potencial constante ao sistema (E ₂). B) Cronoamperograma, com a corrente elétrica em função do tempo (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).	20
Figura 8. Espectroscopia de impedância eletroquímica. A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R _s : resistência da solução; R _{CT} : resistência à transferência de carga; W:	

impedância de Warburg; C_{DL} : capacidade (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008)	21
Figura 9. Modo de funcionamento da AFM. A) Um laser incide sobre o microcantilever e sua reflexão é captada por um detector fotodíodo enquanto a ponteira varre a superfície da amostra e sofre variações em sua posição vertical. B) Tipo de força predominante em relação à distância entre a ponteira e a superfície da amostra (Adaptado de MAVER et al., 2016).....	23
Figura 10. Esquema tridimensional do biossensor construído após sua interação com o alvo. O desenho mostra o peptídeo PRF+1 (em vermelho) imobilizado sobre uma superfície ativada de eletrodos impressos de carbono interagindo com o alvo detectado nas amostras de pacientes com JIA (IgG, em verde). A molécula de bloqueio (albumina sérica bovina) é representada em azul (Fonte: autoria própria).	24
Figura 11. Esquema ilustrativo das modificações que ocorrem na superfície durante as etapas de preparo do biossensor e aplicação do alvo. 1) Eletrodo impresso de carbono (SPCE) limpo. 2) SPCE após a ativação da superfície pelo método cronoamperométrico, com a representação das cargas negativas. 3) Imobilização do peptídeo sobre os eletrodos ativados (SPCE/PRF+1). 4) Etapa de bloqueio (SPCE/PRF+1/BSA). 5) Aplicação de amostras de soro positivas, contendo o alvo (SPCE/PRF+1/BSA/JIA), com destaque para a interação peptídeo-anticorpo (Fonte: autoria própria).	31
Figura 12. Perfis eletroquímicos obtidos para a limpeza e para a ativação dos eletrodos impressos pelo método M3. A) Voltamograma cíclico em solução de ácido perclórico, realizado na faixa de 0,0 a +0,8 V, 50 mV s ⁻¹ . B) Cronoamperograma em solução tampão fosfato com NaCl, realizado com potencial -1,4 V por 300 s.....	35
Figura 13. Voltamogramas cíclicos realizados em solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L ⁻¹) e KCl (0,1 mol L ⁻¹), com faixa de potencial de -0,5 a 0,8 V, 50 mV s ⁻¹ . Os diferentes métodos testados para ativação foram: M0, ausência de tratamento; M1 e M2, voltametrias cíclicas; M3, cronoamperometria. Os parâmetros de cada método estão listados na Tabela 1	36
Figura 14. Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos impressos de carbono sem modificação (SPCE) e modificados com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Solução: tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4); velocidade: 40 mV s ⁻¹	38
Figura 15. Estrutura tridimensional do peptídeo PRF+1 (A <u>CSSW</u> LPRG C GGGS), representada na forma de cartoon, com os resíduos de aminoácidos oxidáveis destacados.....	38
Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos impressos de carbono sem modificação (SPCE) e modificados com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Eletrólito: ferro/ferricianeto de potássio (0,1 mmol L ⁻¹) e KCl (1 mmol L ⁻¹), velocidade: 40 mV s ⁻¹	39
Figura 17. Microscopias de força atômica A) do eletrodo sem modificação (SPCE) e B) modificado com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Perfis laterais C) do eletrodo sem modificação (SPCE) e D) modificado com o peptídeo (SPCE/PRF+1). As medidas foram realizadas no modo não-contato.....	41
Figura 18. Resposta eletroquímica do sistema SPCE/PRF+1/BSA em tampão fosfato antes e após a incubação com as diferentes amostras de soro (HC e JIA). A) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), com velocidade 40 mV s ⁻¹ . Gráficos de barras das respostas B) de corrente de pico	

e C) quantidade de carga para os diferentes sistemas. Os experimentos foram realizados em triplicata.	43
Figura 19. Resposta eletroquímica do sistema SPCE/PRF+1/BSA em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e KCl (1 mmol L^{-1}), antes e após a incubação com as diferentes amostras de soro (HC e JIA). A) Voltamogramas de pulso diferencial, velocidade: 40 mV s^{-1} . Gráficos de barras das respostas de B) corrente de pico e C) quantidade de carga para os diferentes sistemas. Os experimentos foram realizados em triplicata.	45
Figura 20. Diagramas de Nyquist obtidos na espectroscopia de impedância em solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L^{-1}) e KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), para os sistemas SPCE e SPCE/PRF+1/BSA antes e após a aplicação de amostras de soro positivo (JIA) e negativo (HC). As linhas cheias (-) correspondem à simulação para o circuito equivalente representado acima. Parâmetros: faixa de frequência de 100 kHz a 10 mHz , amplitude de 10 mV e potencial de circuito aberto. Foram utilizadas amostras de um indivíduo para cada grupo experimental e o ensaio foi conduzido em duplicata.	47
Figura 21. Gráfico de barras representando os valores de resistência à transferência de carga (R_{CT}) obtidos por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica para os diferentes grupos experimentais. Foram utilizadas amostras de um indivíduo para cada grupo experimental e o ensaio foi conduzido em duplicata.	48
Figura 22. Microscopias de força atômica dos sistemas A) SPCE/PRF+1/BSA, B) SPCE/PRF+1/BSA/HC e C) SPCE/PRF+1/BSA/JIA. As leituras foram realizadas no modo não-contato.	50
Figura 23. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes diluições de soro de um paciente com JIA. Os fatores de diluição estudados foram 300, 100, 50, 35, 25, 10 e 1 (indicados na figura pela seta). Solução: ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com KCl (1 mmol L^{-1}), velocidade: 40 mV s^{-1}	51
Figura 24. A) Relação entre a quantidade carga (Q) calculada a partir dos voltamogramas e o fator de diluição (FD) da amostra de soro positivo. B) Relação entre a quantidade carga (Q) calculada a partir dos voltamogramas e o inverso do fator de diluição ($1/FD$) da amostra de soro positivo, com equação de reta $Q = (-172,7 / FD) + 16,62$ e $r^2 = 0,9989$. Foi utilizada a amostra de um paciente com JIA e os testes foram conduzidos em triplicata.	52
Figura 25. Comparação das cargas quantificadas por VPD para as amostras de soro de diferentes indivíduos negativos (HC) e positivos (JIA). A) Gráfico de barras da quantidade de carga para amostras de diferentes pacientes. B) Comparação das médias e desvios-padrão dos grupos de pacientes negativos e positivos.	53
Figura 26. Quantidade de carga do sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA em função do número de dias de armazenamento do biossensor a 8°C e a seco. Para cada tempo de armazenamento, foram testadas amostras de um mesmo paciente com JIA em duplicata.	54

Resumo

Artrite idiopática juvenil (JIA) corresponde a um amplo grupo de doenças autoimunes e inflamatórias que se desenvolve em crianças e adolescentes com menos de dezesseis anos de idade. Na ausência de diagnóstico e tratamento adequados, pode haver danos irreversíveis nos tecidos das articulações. Os biossensores inserem-se no cenário clínico como promissoras alternativas analíticas para o diagnóstico molecular. Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para o diagnóstico de JIA, utilizando o peptídeo denominado de PRF+1, que em estudo anterior mostrou ser reativo com anticorpo de pacientes com JIA. A superfície dos eletrodos impressos foi ativada pelo método cronoamperométrico antes da imobilização do peptídeo. As detecções eletroquímicas foram conduzidas por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica em solução tampão fosfato e/ou solução de ferro/ferricianeto de potássio. Modificações na morfologia da superfície dos sistemas foram estudadas por microscopia de força atômica. A performance do biossensor foi analisada frente a diferentes diluições de amostras de soro, uso de amostras de diferentes pacientes e estabilidade durante o armazenamento. O biossensor produzido foi capaz de discriminar amostras de diferentes pacientes com JIA dos controles saudáveis. O sistema apresentou faixa linear de resposta entre as diluições 1:25 e 1:300, sensibilidade de $172,8 \mu\text{C} \times \text{FD}$, e limites de detecção e quantificação de 1:784 e 1:235, respectivamente. Além disso, permaneceu funcional por até 40 dias de armazenamento a 8°C . Assim, foi desenvolvida uma plataforma simples, miniaturizada, funcional, estável, seletiva e sensível, estabelecendo-se como uma promissora estratégia de diagnóstico molecular.

Palavras-chave: biossensor eletroquímico, eletrodos impressos de carbono, peptídeo, artrite idiopática juvenil, soro humano

Abstract

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a wide group of autoimmune and inflammatory diseases that affect children and adolescents under the age of sixteen. In the absence of proper diagnosis and treatment, irreversible damage may occur in the joint tissues. Biosensors emerge in the clinical scenario as promising analytical alternatives to the molecular diagnosis. In this work, an electrochemical biosensor was developed for the diagnosis of JIA using PRF+1 peptide, which has been shown to react against antibody from patients with JIA. The screen-printed electrode surface was activated by chronoamperometry prior to immobilization of the peptide. Electrochemical detections were conducted by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy in phosphate buffer and/or potassium ferro/ferricyanide solution. Morphological alterations in the surfaces were studied by atomic force microscopy. The performance of the biosensor was evaluated by testing different serum specimen in different dilutions and stability during storage. The developed biosensor was able to discriminate samples of patients who were diagnosed as having JIA from those that were obtained from healthy individuals. The system presented linear range of response between the dilutions 1:25 and 1:300, sensitivity of $172,8 \mu\text{C} \times \text{DF}$, and limits of detection and quantification of 1:784 and 1:235, respectively. Moreover, the biosensor remained functional for up to 40 days of storage at 8°C . Therefore, a simple, miniaturized, functional, stable, selective and sensitive platform was developed and established as a promising strategy for molecular diagnosis.

Keywords: electrochemical biosensor, screen-printed carbon electrodes, peptide, juvenile idiopathic arthritis, human serum

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1.	Artrite idiopática juvenil.....	1
1.2.	Biossensores.....	3
1.2.1.	Biossensores eletroquímicos.....	5
1.2.2.	Eletrodos impressos.....	8
1.2.3.	Biossensores baseados em peptídeos	10
1.2.4.	Biossensores para diagnóstico de artrites.....	13
1.3.	Técnicas eletroquímicas e microscopia	15
1.3.1.	Voltametria cíclica	16
1.3.2.	Voltametria de pulso diferencial	18
1.3.3.	Crônomoamperometria	19
1.3.4.	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	20
1.3.5.	Microscopia de força atômica.....	22
1.4.	Proposta do presente estudo.....	24
2.	Objetivos	26
2.1.	Objetivo geral	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3.	Material e Métodos.....	27
3.1.	Reagentes e soluções	27
3.2.	Amostras biológicas	28
3.3.	Eletrodos e potencióstatos.....	28
3.4.	Limpeza e ativação dos eletrodos impressos	29
3.5.	Preparo do biosensor.....	30
3.6.	Aplicação das amostras de soro	30
3.7.	Detecções eletroquímicas.....	31
3.8.	Teste da sensibilidade do biosensor usando amostra real.....	32
3.9.	Teste com amostras de diferentes pacientes	33
3.10.	Teste de estabilidade	33
3.11.	Microscopia de força atômica.....	33
3.12.	Análises de Bioinformática.....	33
3.13.	Estatística e tratamento dos dados	34
4.	Resultados e Discussão	35
4.1.	Limpeza e ativação dos eletrodos impressos	35

4.2.	Imobilização do peptídeo PRF+1.....	37
4.3.	Detecção do alvo em amostras de soro humano.....	42
4.4.	Determinação da sensibilidade do biossensor usando diferentes diluições de soro positivo	50
4.5.	Teste com amostras de diferentes pacientes	53
4.6.	Teste de estabilidade	54
5.	Conclusões	56
6.	Referências	57

1. Introdução

1.1. Artrite idiopática juvenil

Artrite idiopática juvenil (JIA, de *idiopathic juvenile arthritis*) corresponde a um amplo grupo de doenças autoimunes e inflamatórias (PETTY et al., 2004; BRUCK; SCHNABEL; HEDRICH, 2015), com desenvolvimento em crianças e adolescentes com idade menor que 16 anos e persistência por seis semanas ou mais (RESTREPO; LEE, 2012), sendo caracterizada por inflamação sinovial e danos aos tecidos das articulações (ABRAMOWICZ et al., 2016).

De acordo com a idade de aparecimento, número de articulações afetadas, presença de biomarcadores específicos e outras observações clínicas, a JIA é dividida em sete subtipos: artrite sistêmica, artrite oligoarticular, artrite poliarticular RF-positiva, artrite poliarticular RF-negativa, artrite relacionada à entese (ERA), artrite psoriática e artrite indiferenciada (RESTREPO; LEE, 2012). A artrite poliarticular é aquela que afeta cinco ou mais articulações durante os primeiros seis meses de doença, podendo ser positiva ou negativa para o fator reumatoide (RF). A artrite oligoarticular, por sua vez, afeta de uma a quatro articulações durante os seis meses iniciais. A artrite sistêmica é caracterizada por artrite acompanhada de febre que dura pelo menos duas semanas, sendo caracterizada como cotidiana por pelo menos três dias, acompanhada por sintomas como exantema eritematoso, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e serosite. As outras formas relacionam-se à ocorrência de artrite com psoríase ou entesite, acompanhadas de outros sintomas (ARMON, 2014).

Em termos epidemiológicos, a incidência e prevalência de doenças autoimunes cresceram nos últimos anos (MORONI; BIANCHI; LLEO, 2012; LERNER; JEREMIAS; MATTHIAS, 2016). No caso específico da artrite idiopática juvenil (JIA), a análise dos dados epidemiológicos pode ser dificultada devido ao uso inconsistente da terminologia, a qual foi alterada recentemente (PETTY et al., 2004; ARMON, 2014); falta de padronização das metodologias adotadas nos estudos, diagnóstico impreciso e dificuldade de acesso dos pacientes ao atendimento médico (OBERLE; HARRIS; VERBSKY, 2014).

Apesar das limitações dos estudos, é bem estabelecido que a JIA é a condição reumatológica mais comum na infância. No que diz respeito à prevalência internacional, a distribuição geográfica é heterogênea, variando de 8 a 400 por 100 mil indivíduos (ABRAMOWICZ et al., 2016). Considerando todos os subtipos de JIA, são relatadas prevalências de 0,83 no Japão, 23 na Noruega, 3,8 em Taiwan e 400 na Austrália para cada 100 mil crianças (OBERLE; HARRIS; VERBSKY, 2014).

Quanto aos conhecimentos relativos aos determinantes etiológicos e fisiopatológicos, há muitas lacunas a serem preenchidas (BERKUN; PADEH, 2010; GOWDIE; TSE, 2012; ARMON, 2014). Contudo, acredita-se que exista uma combinação de fatores ambientais e genéticos (HERSH; PRAHALAD, 2015; ABRAMOWICZ et al., 2016), de modo que vários fatores ambientais poderiam desencadear JIA em hospedeiros geneticamente susceptíveis, incluindo agentes infecciosos, eventos psicosociológicos e tabagismo materno (BERKUN; PADEH, 2010).

No nível molecular, são relatadas a presença de imunocomplexos circulantes e a ativação do sistema do complemento (MOORE, 2016), recrutamento de células T para as articulações e aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias, bem como redução das células T regulatórias e citocinas anti-inflamatórias (ARMON, 2014). Contudo, estes eventos moleculares diferem entre os subtipos de JIA (GOWDIE; TSE, 2012; RESTREPO; LEE, 2012).

Para o diagnóstico de JIA são considerados o histórico médico, manifestação clínica (ABRAMOWICZ et al., 2016), bem como testes laboratoriais que avaliem marcadores de inflamação (como proteína C reativa e taxa de sedimentação de eritrócitos) e o hemograma do paciente (MCMAHON; TATTERSALL, 2011). No que se refere ao diagnóstico por imagem, podem ser utilizados a radiografia, o ultrassom e a ressonância magnética (RESTREPO; LEE, 2012). Contudo, esses métodos tradicionais de diagnóstico necessitam de equipamentos específicos, mão-de-obra qualificada, podem ser demorados, caros e não automatizados, dificultando o diagnóstico precoce e início do tratamento (HENNESSEY et al., 2009; KIM et al., 2013).

Caso não haja diagnóstico e tratamento adequados, pode haver danos irreversíveis nos tecidos das articulações e vísceras, resultando em sequelas

múltiplas, grandes limitações físicas e desfiguração (ABRAMOWICZ et al., 2016), que podem impactar na vida adulta (HERSH; PRAHALAD, 2015). Assim, a JIA tem um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (WIPFF et al., 2016) e potencial de afetar a população economicamente ativa (MINDEN et al., 2004).

Dado as formas atuais de diagnóstico e seu impacto na evolução clínica da doença, é evidente a necessidade de desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e novos biomarcadores, que permitam maior rapidez, especificidade e sensibilidade. De fato, têm sido identificados promissores biomarcadores para JIA, relacionados à previsão do curso da doença, severidade, atividade, remissão, resposta à terapia, entre outros (CONSOLARO et al., 2015).

Neste cenário, a técnica de *phage display* se destaca como uma versátil ferramenta para identificação de biomarcadores (GOULART et al., 2010; ZHANG; XU; WANG, 2011; COELHO et al., 2015; GHOSHAL et al., 2016). Como exemplo, esta técnica possibilitou a seleção de mimetopos (peptídeos miméticos) para o diagnóstico de diferentes formas de artrite (ARAUJO et al., 2015; ARAUJO et al., 2016). Para aprimorar o diagnóstico, as biomoléculas selecionadas podem ser enfim integradas a plataformas nanotecnológicas e biossensores (GOULART et al., 2010; CASTRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

1.2. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos integrados que incorporam um elemento biológico a um sistema de transdução físico-química, com o objetivo de realizar análises seletivas (**figura 1**) (RAPP; GRUHL; LANGE, 2010; TURNER, 2013). São constituídos por um transdutor, que converte um evento bioquímico em um sinal mensurável; um elemento biológico, que é responsável pela especificidade do dispositivo; e um sistema de processamento do sinal obtido (MURUGAIYAN et al., 2014; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). A definição mais clássica considera “um dispositivo integrado autônomo que é capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato espacial direto com um elemento de transdução” (THEVENOT et al., 1996).

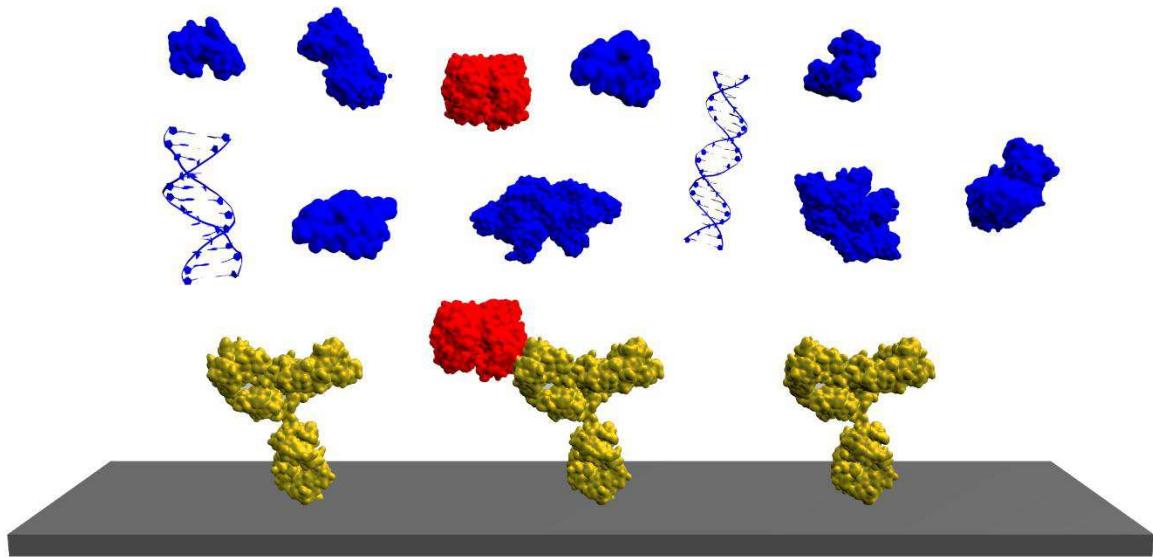


Figura 1. Esquema representativo de um biosensor. Neste caso, a plataforma de transdução é representada pelo plano cinza e o biocomponente é um anticorpo, capaz de reconhecer um alvo específico presente em uma amostra complexa (Fonte: autoria própria).

O conceito de biosensor foi inicialmente empregado por Leyland C. Clark em 1962, quando propôs a incorporação de enzimas a eletrodos existentes para a construção de novos instrumentos bioanalíticos (CLARK; LYONS, 1962). Especificamente, a enzima glicose oxidase foi imobilizada a um eletrodo de platina para a detecção de glicose, inaugurando uma das classes de biosensores mais bem sucedidas comercialmente (RAPP; GRUHL; LANGE, 2010; TURNER, 2013; BUNYAKUL; BAEUMNER, 2015).

Desde então, o número e diversidade de aplicações cresceu, incluindo áreas como o monitoramento e controle de qualidade de alimentos e processos industriais (PIERMARINI et al., 2011; VASILESCU; MARTY, 2016), aplicações clínicas e farmacêuticas (VAN DEN KIEBOOM et al., 2015; KURBANOGLU et al., 2016), monitoramento agrícola e ambiental (KIM et al., 2014; SONGA; OKONKWO, 2016) e aplicações militares (KOMAROVA et al., 2015; KABESSA et al., 2016).

Vantagens como especificidade, sensibilidade, precisão, rapidez, potencial para portabilidade e miniaturização, simplicidade e baixo custo fazem dos biosensores promissoras alternativas às metodologias analíticas convencionais (WANG, 2006). Especialmente em regiões com recursos limitados, como periferias de países em desenvolvimento, áreas rurais ou de difícil acesso, a disponibilidade

de testes rápidos e de fácil uso pode tornar o diagnóstico de doenças mais rápido, preciso e democrático, influenciando diretamente a estratégia de tratamento e a sobrevivência dos pacientes (SHARMA et al., 2015).

Os biossensores podem ser classificados quanto ao tipo de elemento de reconhecimento biológico, tipo de transdução de sinal e tipo de analito detectado. Quanto ao tipo de biocomponente, são classificados em biossensores enzimáticos (enzimas como biocomponentes), imunossensores (anticorpos), genossensores (fragmentos de DNA), aptassensores (aptâmeros) e biossensores microbianos (micro-organismos) (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Outros sistemas de classificação substituem a categoria de biossensores microbianos por biossensores celulares, englobando células de organismos multicelulares e culturas de células (WAGNER et al., 2011; MANKIEWICZ-BOCZEK et al., 2015). Também é mencionada a categoria de biossensores miméticos, cujo biocomponente seria algum material que mimetiza determinadas estruturas biológicas (PERUMAL; HASHIM, 2014). Biossensores contendo aptâmeros e peptídeos como biocomponentes podem ser incluídos na classificação de biossensores miméticos (PERUMAL; HASHIM, 2014) ou considerados separadamente (DOVER et al., 2009; LIU; WANG; BOYD, 2015; VAN DEN KIEBOOM et al., 2015; VASILESCU; MARTY, 2016).

No que se refere ao tipo de transdutor físico-químico, os biossensores são classificados em eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos, fluorescentes, quimioluminiscentes, calorimétricos, magnetoelásticos e biossensores baseados em transistores de efeito de campo (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; VIGNESVAR et al., 2016).

Neste trabalho, técnicas eletroquímicas foram utilizadas para o desenvolvimento de um biossensor para o diagnóstico de artrite idiopática juvenil.

1.2.1. Biossensores eletroquímicos

Biossensores eletroquímicos são aqueles em que o elemento de transdução é um eletrodo, de modo que o evento de reconhecimento biológico é convertido diretamente em um sinal elétrico (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Assim, o foco é a medida de correntes e/ou potenciais elétricos que se

relacionam ao fenômeno eletroquímico desencadeado pelo evento bioquímico (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015).

Os experimentos envolvendo este tipo de biosensor são realizados em células eletroquímicas, comumente constituídas por um sistema de três eletrodos: trabalho, auxiliar e referência. O eletrodo de trabalho é aquele onde se processa a reação de interesse (redução ou oxidação). Entre os principais tipos destacam-se ouro, carbono vítreo, pasta de carbono, grafite, platina, prata, entre outros. O eletrodo de referência possui um potencial conhecido e é usado para estabelecer um potencial constante na célula eletroquímica, sendo o de prata/cloreto de prata o mais comumente utilizado em soluções aquosas. Por fim, o eletrodo auxiliar (ou contra-eletrodo) é utilizado para completar o circuito na célula eletroquímica e é constituído por algum material inerte, como platina, ouro, grafite ou carbono vítreo (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

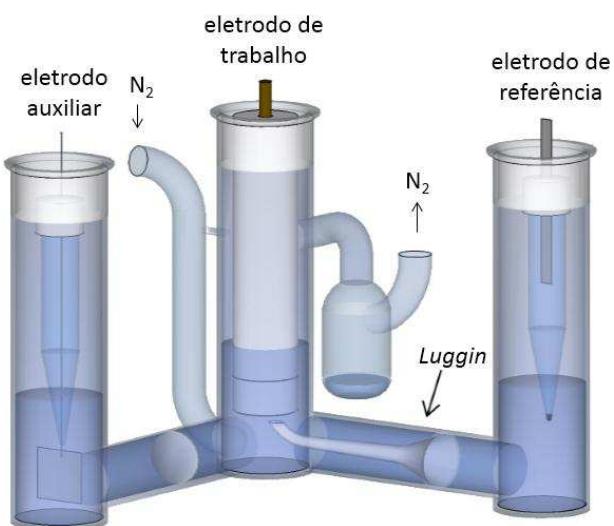


Figura 2. Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três compartimentos, com os eletrodos posicionados. São destacadas as regiões de entrada e saída de gás nitrogênio, bem como o capilar de Luggin, que tem a função de aproximar os eletrodos de trabalho e referência (Fonte: autoria própria).

A **figura 2** ilustra um exemplo de célula eletroquímica com três compartimentos e os eletrodos mencionados corretamente posicionados.

Os biosensores eletroquímicos podem ser classificados quanto à forma como as medidas são realizadas: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, impedimétricos e condutimétricos (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Em medidas potenciométricas, é registrada a diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência quando não há fluxo de corrente significativo entre eles (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015). Exemplos são os eletrodos de pH e outros eletrodos seletivos a íons (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-), que fornecem medidas do potencial através de uma membrana seletiva (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

Em medidas impedimétricas, são monitoradas alterações na capacidade e resistência à transferência de carga, que são causadas pela imobilização ou reconhecimento de biomateriais e levam a alterações na impedância (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Em medidas condutimétricas, a condutividade elétrica de uma solução é monitorada enquanto sua composição iônica muda devido a ocorrência de reações químicas (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015).

Em medidas amperométricas, a oxidação ou redução de uma espécie eletroativa resulta em uma corrente elétrica, que é medida enquanto um potencial constante é mantido no eletrodo de trabalho, em relação ao eletrodo de referência (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015).

Em medidas voltamétricas, são realizadas varreduras dentro de uma faixa de potencial e a corrente elétrica geralmente é registrada na forma de picos, cuja posição corresponde a compostos específicos e cuja altura é proporcional à concentração deste analito (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

De modo geral, entre as vantagens dos biossensores eletroquímicos, destacam-se a sensibilidade, especificidade e precisão, aliados à simplicidade e baixo custo (WANG, 2006). As aplicações são diversas, incluindo o monitoramento clínico (MONOSIK; STRED'ANSKY; STURDIK, 2012; RATHEE et al., 2016), ambiental (BELKHAMSSA et al., 2016; GAO et al., 2016) e controle de qualidade de alimentos (IZADI et al., 2016; ROTARIU et al., 2016).

1.2.2. Eletrodos impressos

Os eletrodos impressos (SPE, de *screen-printed electrodes*) são dispositivos desenvolvidos a partir da deposição de um filme condutor sobre um substrato inerte, podendo ser seguida pela cobertura por uma camada isolante (NASCIMENTO, 1998). São produzidos pela técnica de serigrafia, que permite a obtenção de várias impressões com o mesmo *design*.

Esta técnica existe há mais de mil anos, sendo empregada nos dias de hoje nos setores artístico, têxtil e publicidade (LI, M. et al., 2012; LIU; ZHANG; LIU, 2015; SUIKKOLA et al., 2016). A técnica consiste no uso de uma tela com áreas abertas (por onde a tinta passa) e áreas sólidas, que funcionam como uma máscara que impede a passagem da tinta (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Assim, a tinta é depositada sobre um substrato sólido de forma controlada, reproduzindo o formato das áreas abertas da tela (NASCIMENTO, 1998).

As vantagens dos eletrodos impressos incluem a possibilidade de produção em série e o baixo custo, a alta reprodutibilidade, a versatilidade de aplicações (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015), uso de pequenos volumes de amostra, rapidez, automação e portabilidade (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). Além disso, ao alterar o foco da busca de novas composições de eletrodos para o estudo de sua forma geométrica (miniaturização), os processos de transporte de massa que ocorrem na interface eletrodo-solução mudam de um padrão linear ou planar para uma forma de difusão convergente ou radial, resultando em melhora do sinal analítico (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). Algumas desvantagens e limitações dessas plataformas incluem a dificuldade de produção em escala micrométrica, possível obtenção de resultados menos reproduzíveis, presença de eletrodos de pseudo-referência e reuso dificultado (MOHAMED, 2016).

A **figura 3** ilustra, por meio de uma representação esquemática, um exemplo de eletrodo impresso comercialmente disponível.



Figura 3. Representação esquemática de um eletrodo impresso comercialmente disponível. Neste eletrodo, o sistema de três eletrodos é integrado e miniaturizado, fortalecendo aspectos propostos para os biossensores, como portabilidade, baixo custo e uso de pequenos volumes de amostra (Fonte: autoria própria).

Vários biossensores baseados em eletrodos impressos estão descritos na literatura, especialmente de carbono (SPCE, de *screen-printed carbon electrode*), utilizados neste estudo. Abbaspour; Noori (2012) utilizaram estes eletrodos para desenvolver uma estratégia de detecção eletroquímica de polimorfismos de base única em sequências de DNA, utilizando nanopartículas conjugadas a mononucleotídeos e o sistema de afinidade biotina/estreptavidina. A estratégia possibilitou a determinação precisa de mutações, na faixa de 50 a 600 mol L⁻¹.

Revenga-Parra et al. (2014) também desenvolveram uma plataforma para detecção de fragmentos de DNA utilizando SPCE. A estratégia consistiu em desenvolver uma plataforma condutora diazonizada sobre a qual foram covalentemente ligados oligonucleotídeos de DNA. O gene humano MRP3 foi detectado com limite de detecção de 210 pg µL⁻¹. Bagheryan et al. (2016) utilizaram SPCE modificado com uma camada de diazônio para a imobilização de um aptâmero. O sistema foi empregado na detecção impedimétrica de *Salmonella typhimurium* em amostras de alimentos, com limite de detecção de 6 CFU mL⁻¹.

Por outro lado, Chan et al. (2016) modificaram a superfície dos SPCE com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido para o desenvolvimento de um imunossensor voltado para a detecção do antígeno carcinoembrionário, relacionado a alguns tipos de câncer. A estratégia resultou nos limites de detecção 0,28 ng mL⁻¹ e 181,5 ng mL⁻¹. Yang et al. (2014) apresentaram a modificação dos SPCE com nafion, grafeno e conjugados de nanopartículas de ouro e óxido de ferro como plataforma para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para

determinação de clenbuterol em amostras suínas, obtendo limite de detecção de 0,22 ng mL⁻¹.

Além dos exemplos apresentados, as aplicações dos eletrodos impressos incluem as áreas clínica (MALECKA et al., 2016), farmacêutica (FRAG et al., 2011), ambiental (PEREZ-RAFOLS et al., 2016), industrial (ALMEIDA et al., 2016) e defesa (CETO et al., 2013). Novas configurações de eletrodos impressos incluem o uso de substratos flexíveis e não planos, como roupas e a própria epiderme humana (LI et al., 2012).

1.2.3. Biossensores baseados em peptídeos

Os aminoácidos são as unidades fundamentais dos peptídeos e proteínas, sendo constituídos por um átomo de carbono central (carbono α) ligado a quatro grupos: um átomo de hidrogênio, um grupo α -carboxílico, um grupo α -amino e uma cadeia lateral diferente para cada aminoácido, designada genericamente como grupo R. Os peptídeos são pequenos polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Por sua vez, as ligações peptídicas (também chamadas de ligações amídicas) são formadas pela união do grupo α -carboxílico de um aminoácido ao grupo α -amino de outro aminoácido (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012). A **figura 4** ilustra a estrutura de aminoácidos e peptídeos.

Atualmente, tem se destacado aplicações de peptídeos principalmente nas áreas clínica (CARDONA; MONCADA; GOMEZ-MARIN, 2015; LECAILLE; LALMANACH; ANDRAULT, 2016) e industrial (LACOU; LÉONIL; GAGNAIRE, 2016; WANG et al., 2016), sendo obtidos de diversas fontes, como peixes (RAJANBABU; CHEN, 2011), artrópodes (HARRISON et al., 2014), plantas (CARVALHO; GOMES, 2011), seleção e otimização em bibliotecas artificiais (ARAUJO et al., 2016; LIU, et al., 2016) e síntese química (BONDALAPATI; JBARA; BRIK, 2016).

Os peptídeos têm sido empregados em biossensores como elementos de reconhecimento, substratos enzimáticos e plataformas transdutoras. Tais aplicações têm crescido, principalmente, devido a vantagens como a grande estabilidade em comparação com proteínas maiores e anticorpos, protocolo de

síntese padronizado, possibilidade de modificação com marcadores, grande versatilidade química e especificidade (PAVAN; BERTI, 2012; LIU; WANG; BOYD, 2015).

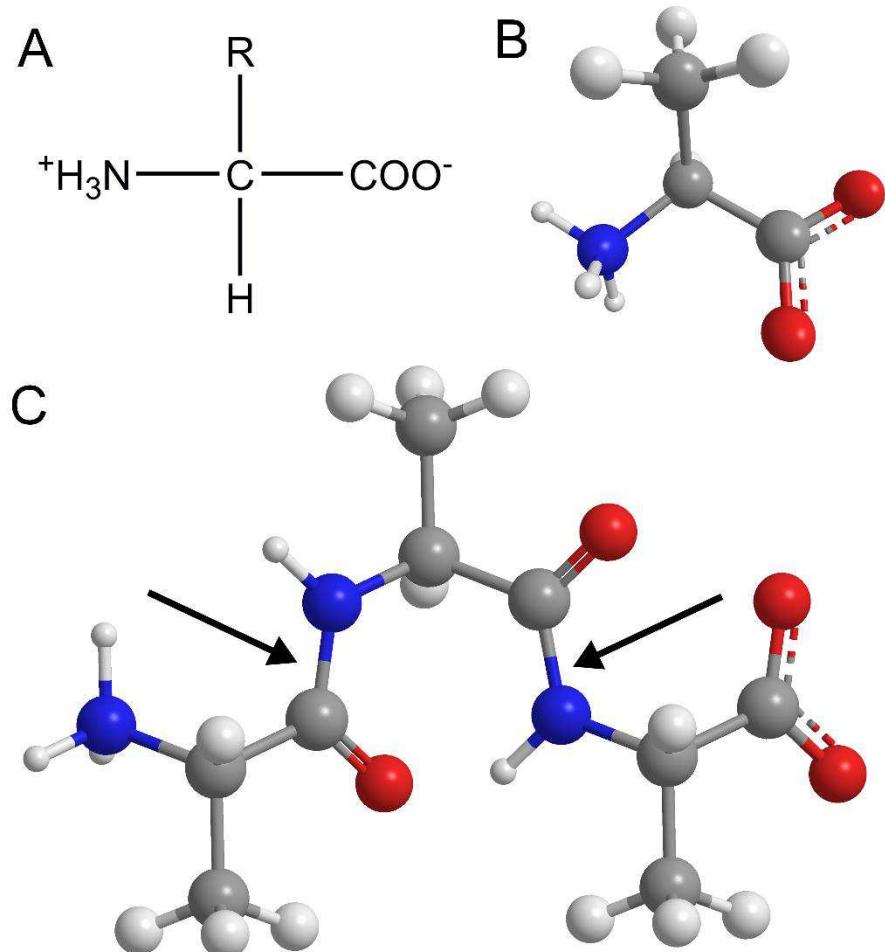


Figura 4. Representação de aminoácidos e peptídeos. A) Fórmula estrutural geral dos aminoácidos, com um carbono- α central ligado a um grupo carboxílico, um grupo amino, um hidrogênio e a cadeia lateral variável (R). B) Representação tridimensional da L-alanina, cuja cadeia lateral é um radical metil (-CH₃). C) Representação tridimensional de um tripeptídeo composto apenas por resíduos de alanina, destacando as ligações peptídicas com setas. Nas representações tridimensionais, foi utilizado o modelo de esferas e bastões, com átomos de carbono representados em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul (Fonte: autoria própria).

Muitos peptídeos selecionados pela técnica de *phage display* podem ser aplicados em biossensores. A técnica consiste na expressão de peptídeos e polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos. Assim, são construídas bibliotecas com grande diversidade de sequências para aplicações em terapêutica e diagnóstico (GALAN et al., 2016).

Yang, J. et al. (2014) isolaram um heptapeptídeo flanqueado por resíduos de cisteína pela técnica de *phage display* e o aplicaram na construção de um biossensor eletroquímico para a detecção de bisfenol A. O peptídeo foi aplicado sobre eletrodos de ouro e a interação ocorreu via resíduos de cisteína. O sistema foi capaz de determinar bisfenol A seletivamente, com intervalo linear de detecção de 1 a 5000 nmol L⁻¹. Arevalo et al. (2012) empregaram partículas de bacteriófagos contendo peptídeos expressos para a construção de um biossensor magneto-eletroquímico para a detecção do herbicida molinato. O sistema foi desenvolvido sobre eletrodos impressos de carbono e apresentou intervalo linear de detecção entre $4,4 \times 10^{-3}$ a 10 ng mL⁻¹.

Alguns peptídeos têm sido especialmente desenhados para aplicações em biossensores. Shinohara; Kuramitz; Sugawara (2015) desenvolveram uma estratégia de detecção da proteína ovoalbumina a partir da combinação de um domínio peptídico de reconhecimento da proteína, com um domínio eletroativo planejado, constituído de resíduos de tirosina e cisteína. Assim, foi obtida uma sonda peptídica específica para o alvo e eletroativa, cujo sinal poderia ser monitorado sem o uso de marcadores. O peptídeo foi imobilizado em eletrodos de carbono vítreo e o limite de detecção obtido foi de 10⁻¹² mol L⁻¹.

Liu et al. (2016) desenvolveram um biossensor eletroquímico sem marcadores (*label-free*) a partir da imobilização de um peptídeo planejado em um eletrodo de ouro, via resíduo de cisteína. O biossensor foi capaz de detectar bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, diferenciando as vivas das mortas. O limite de detecção obtido pelo sistema foi de 10² CFU mL⁻¹.

Uma estratégia comumente adotada tem sido a modificação dos peptídeos com marcadores redox, como o ferroceno. Li et al. (2012) desenvolveram um biossensor eletroquímico em eletrodos de ouro para quantificação do oligômero solúvel amiloide β 1–42, um importante fator patogênico na doença de Alzheimer. Como sonda, foi utilizado um peptídeo específico modificado com ácido 11-mercaptoundecanoico na região N-terminal e ferroceno na região C-terminal. O princípio de funcionamento do sistema envolvia mudanças na transferência de elétrons mediante a ligação do alvo. O biossensor apresentou faixa linear de detecção entre as concentrações 480 pM e 12 nM de alvo.

Seguindo a mesma linha, Li et al. (2013) desenvolveram um biossensor eletroquímico para a detecção do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), cuja expressão é aumentada em certos tipos de câncer. Um eletrodo de ouro foi modificado com um peptídeo bioconjugado com ferroceno na região C-terminal e 9-mercaptop-1-nonanol na região N-terminal. Com a ligação do EGFR, o peptídeo alterava sua conformação e aproximava a porção contendo ferroceno da superfície do eletrodo, aumentando a transferência de elétrons. Com este biossensor, obteve-se faixa linear de resposta entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-10}$ g L $^{-1}$, com limite de detecção de $3,7 \times 10^{-11}$ g L $^{-1}$.

Li et al. (2014) desenvolveram um biossensor eletroquímico para a detecção de uma cepa patogênica de *Escherichia coli*, também utilizando eletrodo de ouro e ferroceno, porém com algumas diferenças em relação aos trabalhos mencionados. Foi preparada uma monocamada automontada de ácido lipoico-NHS, sobre a qual foi aplicado um derivado do ferroceno contendo um grupo carboxílico, que foi ativado pelo sistema EDC/NHS para a imobilização do peptídeo antimicrobiano. O sistema foi seletivo entre espécies e cepas e apresentou faixa linear de resposta de 10^3 a 10^7 UFC mL $^{-1}$.

1.2.4. Biossensores para diagnóstico de artrites

No caso da artrite reumatoide (RA), existem alguns exemplos de biossensores baseados em peptídeos relatados na literatura. Drouvalakis et al. (2008) desenvolveram um biossensor piezoelétrico a partir da deposição de nanotubos de carbono sobre o cristal de quartzo e posterior imobilização de um peptídeo contendo citrulina cíclica, via ligação com Tween-20 funcionalizado com grupos carboxílicos. O sistema foi desenvolvido para o diagnóstico de artrite reumatoide em amostras de soro humano e foi capaz de detectar o alvo em faixas de concentrações femtomolares, superando o teste de ELISA.

Villa et al. (2011) desenvolveram um biossensor amperométrico também para detecção de artrite reumatoide em amostras de soro humano. Um peptídeo químérico sintético foi imobilizado sobre um compósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e poliestireno depositado sobre eletrodos de filme fino de ouro

ou platina. O sistema foi capaz de detectar os anticorpos anti-peptídeos citrulinados presentes nas amostras de soro positivas.

Outros tipos de biossensores também são relatados. Como exemplo, Bertok et al. (2015) construíram biossensores impedimétricos baseados em eletrodos de ouro e camadas automontadas de carboxibetaína tiolada. O sistema utilizou lectinas como sondas para detecção das glicoproteínas fetuína (FET) e asialofetuína (ASF) em soro de pacientes com RA, com limites de detecção de 73 pmol L⁻¹ e 2,7 nmol L⁻¹, respectivamente. Renger et al. (2010) desenvolveram um imunoensaio de fluxo lateral utilizando membrana de nitrocelulose e anticorpos contra o fator reumatoide (RF) e a vimentina citrulinada-mutada (MCV). Quando aplicada a amostras de soro de pacientes com RA, a metodologia obteve especificidade de 99,1% e 91,2% para os anticorpos anti-RF e anti-MCV, respectivamente.

Pang et al. (2015) desenvolveram uma plataforma fotoeletroquímica com eletrodos de óxido de índio-estanho (ITO), nanobastões de ZnO, nanocristais semicondutores e nitreto de carbono para a imobilização de sondas de DNA. O sistema foi planejado para a detecção do gene PCSK6, relacionado ao desenvolvimento de artrite reumatoide, obtendo um limite de detecção de 2 pg mL⁻¹. Ahn et al. (2011) também utilizaram ZnO para desenvolver um teste sensível para diagnóstico de RA. Como sonda, foi utilizado o peptídeo citrulinado cíclico ligado a nanobastões de ZnO. Esta configuração foi selecionada devido à presença do motif RCGRS, que tem afinidade pelo ZnO, sendo capaz de detectar o alvo em diluições de soro de até 5 mil vezes.

Para o caso específico da artrite idiopática juvenil (JIA), há poucos exemplos de biossensores na literatura. Araujo et al. (2016) apresentaram um estudo inicial de detecção eletroquímica em amostras de soro de pacientes com JIA, utilizando eletrodos de ouro modificados com o peptídeo PRF+1. Este peptídeo se liga a anticorpos específicos do soro de pacientes com JIA e também foi utilizado para a construção de um biossensor eletroquímico no presente estudo.

1.3. Técnicas eletroquímicas e microscopia

No que diz respeito às técnicas eletroquímicas, são de fundamental importância as reações de oxirredução, nas quais elétrons são transferidos de um reagente para outro. Os agentes oxidantes são espécies com grande afinidade por elétrons, enquanto os agentes redutores doam elétrons para outras espécies. Essa transferência de elétrons pode ser conduzida em células eletroquímicas (SKOOG et al., 2006).

Uma célula eletroquímica consiste em condutores (eletrodos) imersos em soluções eletrolíticas, que podem ser espacialmente separadas. Os eletrodos em que ocorrem reações de oxidação e redução são denominados ânodo e cátodo, respectivamente. As células eletroquímicas galvânicas ou voltaicas são aquelas que operam espontaneamente e armazenam energia elétrica, enquanto as células eletrolíticas requerem uma fonte externa de energia para funcionamento. Nas células eletroquímicas, as reações de oxidação e redução que ocorrem no ânodo e no cátodo acoplam a condução iônica na solução à condução eletrônica nos eletrodos, sendo o limite de fase entre eletrodo e solução denominado de interface (SKOOG et al., 2006).

Nas células eletroquímicas, podem ser medidos o potencial e a corrente elétrica. O potencial elétrico (símbolo: E , unidade: V) representa a energia elétrica necessária para transferir uma carga de teste do infinito no vácuo até um determinado ponto no espaço (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). A corrente elétrica (símbolo: I , unidade: A) é definida como o fluxo de carga elétrica. Em uma célula eletroquímica, dois tipos de corrente elétrica podem fluir pelo circuito que conecta os eletrodos: faradaica e capacitiva. A corrente faradaica está relacionada à transferência de carga e às reações de oxidação e redução. A corrente capacitativa está ligada ao acúmulo de carga e a mudanças na estrutura da dupla camada eletroquímica, devido a processos de adsorção e dessorção (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Os fenômenos que acontecem nas células eletroquímicas podem ser estudados por uma série de técnicas desenvolvidas, com grande sensibilidade e ampla aplicação. Algumas delas são descritas a seguir.

1.3.1. Voltametria cíclica

As técnicas potenciodinâmicas são um grupo amplo e fundamental para estudos eletroquímicos, em que um potencial dependente de tempo é aplicado a um sistema eletroquímico e a resposta de corrente é registrada. Neste grupo, destacam-se técnicas como a voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

A VC é um tipo de voltametria amplamente utilizada, em que a resposta de corrente elétrica do sistema é registrada mediante a aplicação de valores de potencial que aumentam e diminuem linearmente, em ciclos (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). Embora não seja usualmente empregada em análises quantitativas, devido a uma menor sensibilidade; é indicada para o estudo do comportamento de pares redox (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Por meio desta técnica, podem ser obtidas informações como o potencial de oxidação ou redução associado a determinado processo, o estado de oxidação de determinadas espécies, o número de elétrons envolvidos, a taxa de transferência eletrônica e efeitos de adsorção (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

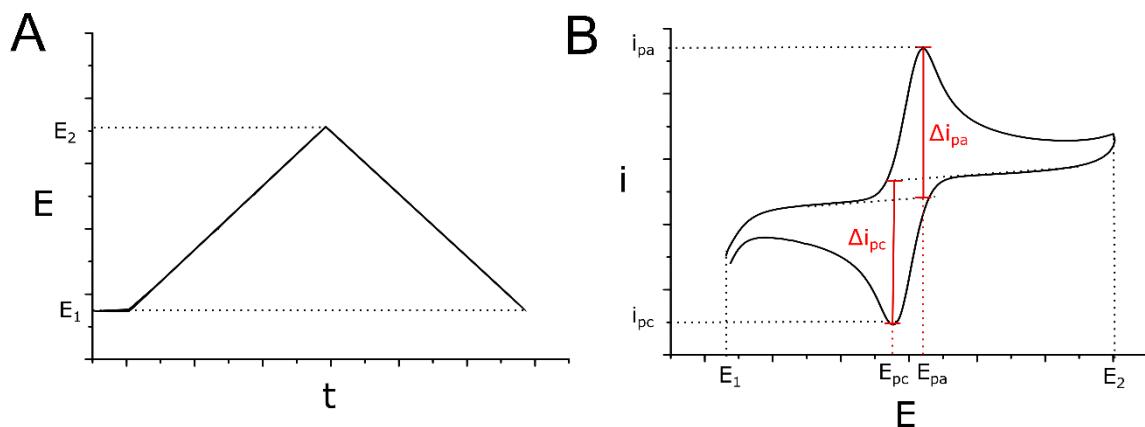


Figura 5. Representações gráficas da voltametria cíclica. A) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado de E_1 a E_2 , em seguida retornando a E_1 . B) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar os picos de oxidação e redução. E : potencial elétrico; i : corrente elétrica; E_{pc} : potencial de pico catódico; E_{pa} : potencial de pico anódico; i_{pc} : corrente de pico catódico; i_{pa} : corrente de pico anódico. O delta (Δ) representa a variação de corrente de pico, com a subtração da corrente de pico pela corrente na base do pico (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Conforme ilustrado na **figura 5**, a varredura de potencial é realizada inicialmente de E_1 a E_2 , e então de E_2 a E_1 , com velocidade de varredura fixa. Se

houver algum composto eletroativo presente no sistema, podem ser detectados picos de oxidação, em um potencial de pico anódico (E_{pa}) e com corrente de pico anódico (i_{pa}) específicos; e/ou picos de redução, em um potencial de pico catódico (E_{pc}) e com corrente de pico catódico (i_{pc}) específicos. Para as correntes de pico, pode ser realizada a subtração da corrente na base do pico, o que resulta na variação de corrente de picos anódico e catódico (Δi_{pa} e Δi_{pc}) (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

A magnitude da corrente de pico (i_p) para um sistema em que a transferência de elétrons é reversível é dada pela equação de Randles-Ševčík (**equação 1**).

$$i_p = 0,446nFAc \sqrt{\frac{nF\nu D}{RT}}$$

Equação 1

Nesta equação, i_p é relacionada aos seguintes fatores: número de elétrons transferidos por molécula (n), constante de faraday (F), área do eletrodo (A), concentração do analito (c), constante dos gases (R), temperatura absoluta (T), velocidade de varredura (ν) e coeficiente de difusão (D) (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Para o caso de sistemas eletroquimicamente reversíveis, com espécies redox imobilizadas na superfície do eletrodo, a i_p é diretamente proporcional à velocidade de varredura (ν), conforme a **equação 2**.

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} \nu A \Gamma$$

Equação 2

Neste caso, Γ corresponde à concentração superficial, para espécies eletroativas imobilizadas (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

1.3.2. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é um tipo de voltametria em que pulsos periódicos de potencial são superpostos a uma varredura linear (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). As medidas de corrente são realizadas antes do início e pouco antes do final de cada pulso de potencial, sendo que a diferença entre esses valores é amplificada e registrada. A VPD é uma das técnicas voltamétricas mais sensíveis, já que, nestas condições, a razão entre corrente faradaica e corrente capacitativa é maximizada (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). A **figura 6** ilustra as representações gráficas da voltametria de pulso diferencial.

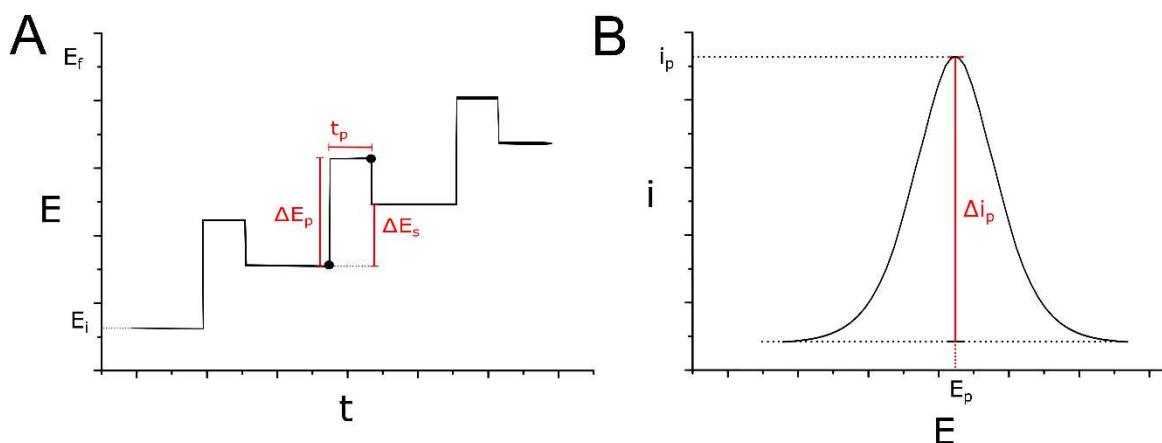


Figura 6. Representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. A) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. B) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico. (Adaptado de SCHOLZ, 2010 e KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Para sistemas reversíveis, pode ser aplicada a **equação 3**.

$$\Delta i_p = \frac{nFAD^{1/2}C^*}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right)$$

Equação 3

Esta equação mostra que a variação da corrente de pico (Δi_p) é diretamente proporcional a: número de elétrons transferidos (n), constante de Faraday (F), área

do eletrodo (A), raiz quadrada do coeficiente de difusão da espécie eletroativa (D) e concentração da espécie na solução (C^*). Além disso, é inversamente proporcional às raízes quadradas de π e do período de pulso (t_p). Ainda, $\sigma = \exp(nF\Delta E_p / 2RT)$, onde ΔE_p é a variação de potencial de pulso, R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008; SCHOLZ, 2010).

1.3.3. Cronoamperometria

A cronoamperometria (CA) é uma técnica amperométrica em que a corrente é medida em função do tempo após a aplicação de uma perturbação de potencial. Ao contrário de condições de equilíbrio, a corrente decresce ao longo do tempo, já que o gradiente de concentração da espécie eletroativa (R) também diminui (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

No caso de eventos redox simples, em que a corrente depende da taxa de difusão do analito, a resposta de corrente pode ser descrita pela equação de Cottrell (**equação 4**).

$$i = nFAC_R^b \sqrt{\frac{D_R}{\pi t}}$$

Equação 4

Nesta equação, a corrente (i) é relacionada aos seguintes fatores: número de elétrons transferidos por molécula (n), constante de Faraday (F), área do eletrodo (A), tempo (t), concentração total (c_R^b) e coeficiente de difusão (D_R) da espécie eletroativa R (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

A equação é válida para eletrodos planos em contato com uma solução sem agitação, contendo eletrólito em excesso e uma pequena concentração da espécie eletroativa, cujo transporte para o eletrodo é somente difusional. Ela mostra que a corrente decresce proporcionalmente ao inverso da raiz quadrada do tempo, não alcançando uma corrente de equilíbrio. Contudo, em medidas experimentais, esta resposta de corrente pode ser perturbada pela corrente capacitiva e fenômenos de convecção (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). A **Figura 7** ilustra as representações gráficas da cronoamperometria.

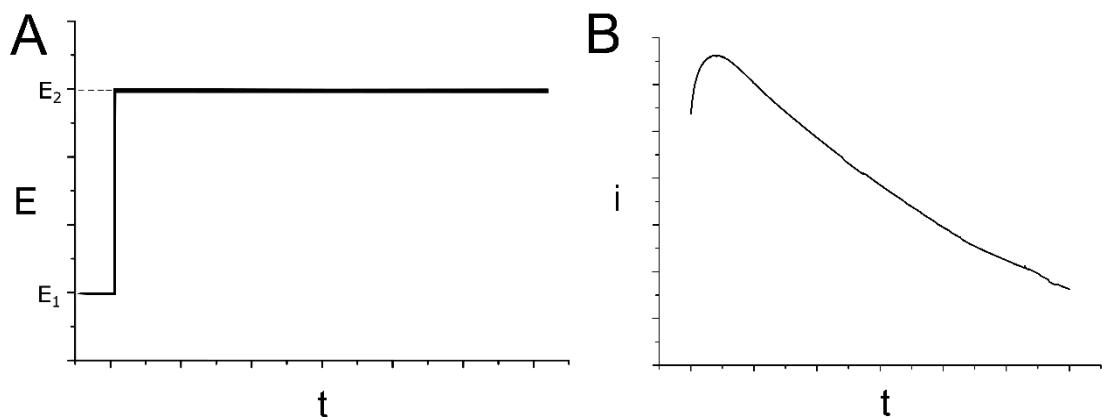


Figura 7. Representações gráficas da cronoamperometria. A) Gráfico de potencial em função do tempo: após uma súbita variação, é aplicado um potencial constante ao sistema (E_2). B) Cronoamperograma, com a corrente elétrica em função do tempo (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

1.3.4. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A lei de Ohm (**equação 5**) estabelece que existe uma relação linear entre a corrente (i) e a diferença de potencial (U) em um circuito elétrico, sendo a resistência (R) o fator de proporcionalidade.

$$i = \frac{U}{R}$$

Equação 5

Em circuitos de corrente alternada, em que U e i são funções periódicas do tempo, a lei de Ohm pode ser estendida para a impedância (Z) (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). A impedância é expressa na forma de um número complexo, em que a resistência (em ohms) é o componente real e a reatância capacitiva é o componente imaginário (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

$$Z = (E'/I') \exp(-i\varphi)$$

Equação 6

Na **equação 6**, Z é a impedância, E'/I' corresponde à razão das amplitudes de oscilação de potencial e corrente, φ representa o ângulo de fase e i representa

a unidade imaginária, $(-1)^{1/2}$. Outra forma de expressar a impedância, conforme as **equações 7 e 8**, é por meio de seus componentes real (Z') e imaginário (Z'') (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

$$Z' = (E'/I') \cos \varphi \quad \text{Equação 7}$$

$$Z'' = -(E'/I') \operatorname{sen} \varphi \quad \text{Equação 8}$$

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que mede a impedância de um sistema eletroquímico, como função da frequência de uma perturbação sinusoidal de pequena amplitude (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). Entre as formas comuns de representação, destaca-se o diagrama de Nyquist, em que dados relativos a diversas frequências são representados em um plano complexo de impedância. Também é comumente utilizado o diagrama de Bode, em que são representados os valores absolutos de impedância e deslocamento de fase em função da frequência (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Os dados obtidos por esta técnica são analisados mediante um modelo teórico de circuito elétrico, que pode possuir elementos que representem a resistência da solução, resistência ao transporte de carga, capacitância entre o eletrodo e os íons carregados na solução e impedância devida à taxa de difusão do composto redox até o eletrodo (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). A **figura 8** ilustra a representação dos dados impedimétricos pelo diagrama de Nyquist e um modelo de circuito equivalente.

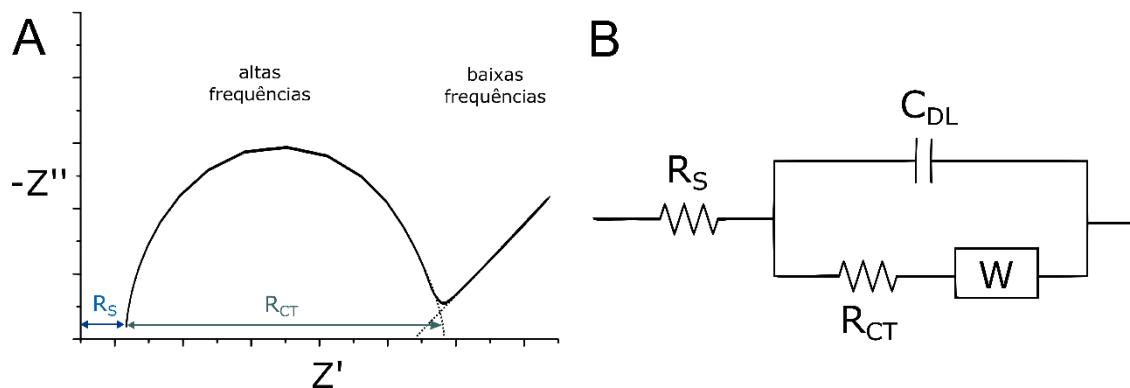


Figura 8. Espectroscopia de impedância eletroquímica. A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Outro sistema de coordenadas, o diagrama de Cole-Cole, relaciona os componentes capacitivo e resistivo da impedância, permitindo a extração de dados experimentais e resultando em um diagrama que tem a forma típica de um semicírculo com centro no eixo horizontal. Neste sistema, a frequência não é explicitamente aparente e seus valores correspondentes podem ser mostrados nos pontos individuais, quando necessário. Para sistemas mais complexos, devem ser considerados tanto fatores cinéticos, quanto mudanças de concentração. Nestes casos, os diagramas podem ser avaliados apenas qualitativamente ou considerando separadamente os segmentos com semicírculos (cinéticos) e linhas retas (difusionais) (BAGOTSKY, 2005).

1.3.5. Microscopia de força atômica

Como outras microscopias de varredura por sonda, a microscopia de força atômica (AFM, de *atomic force microscopy*) é realizada com um microscópio composto por uma fina sonda que realiza varreduras próximo ou em contato com a superfície, um sistema piezoelétrico que controla a separação ponteira/superfície e translações no mesmo plano, e um sistema de *feedback* que mantém a ponteira próxima da superfície (COHEN; BITLER, 2008).

O microscópio de força atômica possui uma fina ponteira na extremidade de um microcantilever em contato ou a pequenas distâncias da superfície a ser estudada. Um *laser* incide na parte de trás do microcantilever e sua deflexão é captada por um detector fotodiodo. Conforme o sistema varre a superfície, a ponteira sofre variações em sua posição vertical, em resposta à topografia da amostra, para manter uma posição constante no ponto em que o *laser* incide. A voltagem utilizada para movimentar a ponteira para cima ou para baixo corresponde ao dado de altura que é utilizado na construção da imagem topográfica (ALLISON et al., 2010).

O microscópio de força atômica pode operar em diferentes modos, como contato, não-contato e contato intermitente. No modo contato, a distância entre a ponteira e a superfície da amostra é inferior a 0,5 nm e predominam forças repulsivas. Como a altura do cantilever é continuamente ajustada para manter uma

força constante, sua deflexão é monitorada e a força resultante é calculada de acordo com a lei de Hooke (**equação 9**) (HUEBSCHEN et al., 2016).

$$F = -kD$$

Equação 9

Nesta equação, F é a força (N), k é a constante de mola da sonda (N m⁻¹) e D é a distância de deflexão (m) (EATON; WEST, 2010).

No modo não-contato, a distância entre a ponteira e a superfície da amostra está entre 0,1 e 10 nm. Neste caso, predominam forças atrativas, que afetam a frequência de ressonância e amplitude de vibração do cantilever. Por fim, no modo contato intermitente, o contato entre a ponteira e a superfície ocorre por um pequeno tempo, diminuindo o efeito de forças laterais e evitando que a amostra seja danificada (HUEBSCHEN et al., 2016).

A escolha do modo de operação mais adequado depende da natureza da amostra a ser avaliada (rigidez, rugosidade), tempo de varredura, objetivo do experimento, entre outros (HUEBSCHEN et al., 2016). A **figura 9** esquematiza o modo de funcionamento da AFM.

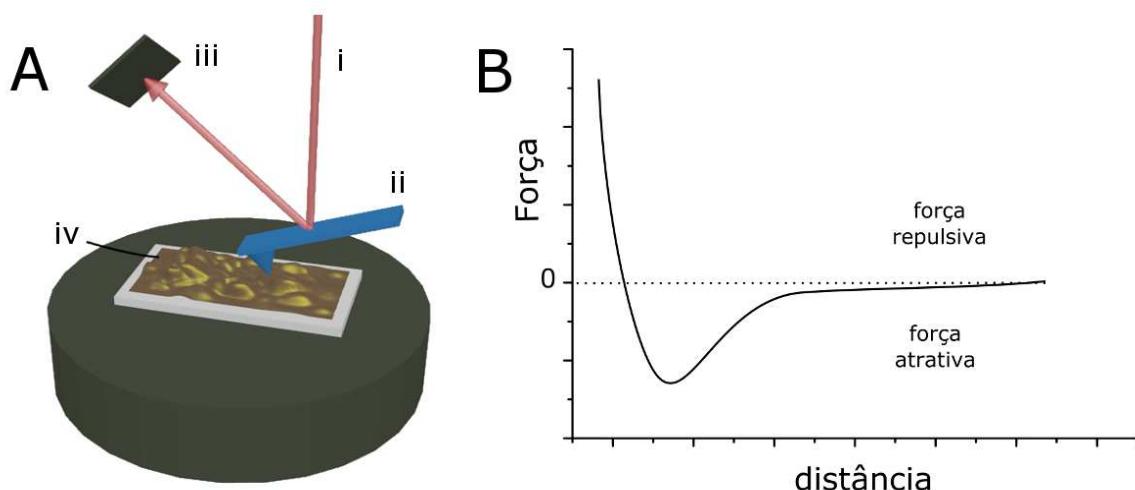


Figura 9. Modo de funcionamento da AFM. A) Um *laser* (i) incide sobre o microcantilever (ii) e sua reflexão é captada por um detector fotodiodo (iii) enquanto a ponteira varre a superfície da amostra (iv) e sofre variações em sua posição vertical. B) Tipo de força predominante em relação à distância entre a ponteira e a superfície da amostra (Adaptado de MAVER et al., 2016).

1.4. Proposta do presente estudo

Em um estudo anterior, Araujo et al. (2016) utilizaram uma biblioteca de sequências randômicas de peptídeos, obtida por *phage display*, para selecionar ligantes específicos de anticorpos (IgGs) isolados de amostras de soro de pacientes com artrite idiopática juvenil (JIA). Em seguida, os peptídeos fusionados em fagos selecionados contra autoanticorpos circulantes foram avaliados pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), para demonstrar suas reatividades contra o alvo de interesse. Destes, o peptídeo fusionado PRF+1 apresentou maior especificidade e foi sintetizado para validação com maior número amostral. O peptídeo sintético PRF+1 apresentou especificidade de 91% e sensibilidade de 61% na discriminação de pacientes com JIA em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Assim, foi empregado no desenvolvimento de uma plataforma para análises eletroquímicas das amostras de soro, discriminando os diferentes grupos.

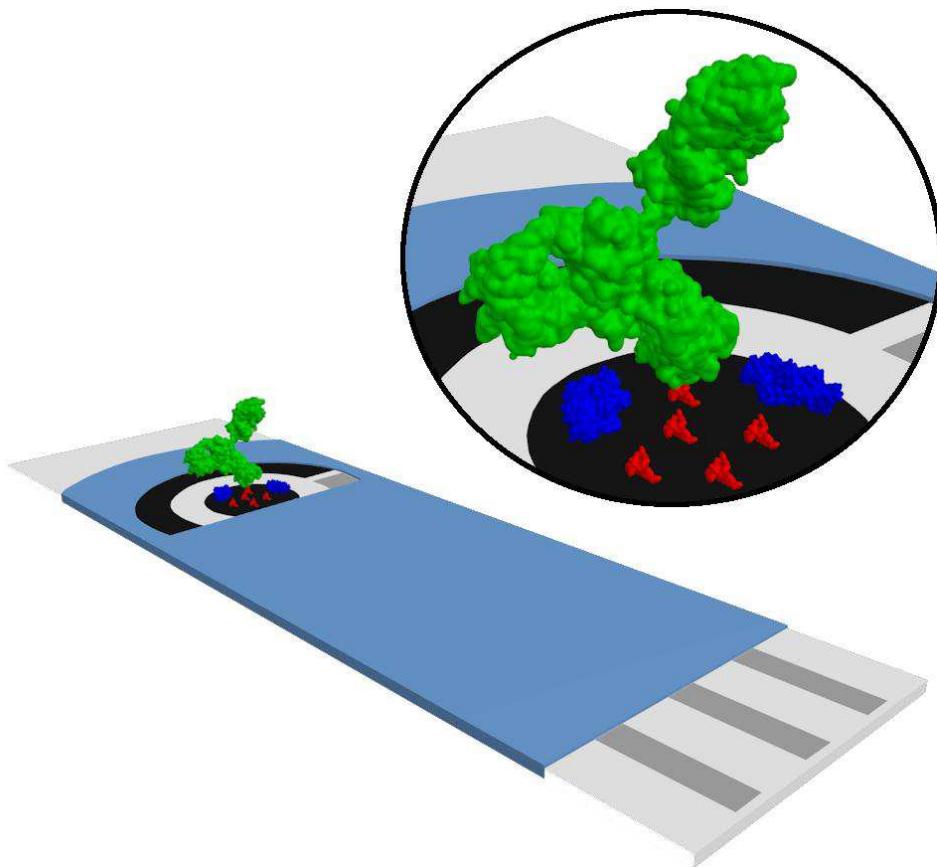


Figura 10. Esquema tridimensional do biosensor construído após sua interação com o alvo. O desenho mostra o peptídeo PRF+1 (em vermelho) imobilizado sobre uma superfície ativada de eletrodos impressos de carbono interagindo com o alvo detectado nas amostras de pacientes com JIA (IgG, em verde). A molécula de bloqueio (albumina sérica bovina) é representada em azul (Fonte: autoria própria).

No presente estudo, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para o diagnóstico de JIA por meio da imobilização do peptídeo PRF+1 em eletrodos impressos de carbono (SPCE) ativados. A interação de PRF+1 com seu alvo foi avaliada por meio de diversas técnicas eletroquímicas e diferentes condições, bem como por microscopia de força atômica. A **figura 10** representa esquematicamente o biossensor construído após interação com o alvo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- ✓ Desenvolver um biossensor eletroquímico com o peptídeo PRF+1 e eletrodos impressos de carbono para o diagnóstico de artrite idiopática juvenil utilizando amostras de soro humano.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Estudar e selecionar um método de ativação da superfície dos eletrodos impressos para imobilização da sonda;
- ✓ Imobilizar o peptídeo PRF+1 sobre a superfície de eletrodos impressos e investigar a modificação da superfície por métodos eletroquímicos e microscópicos;
- ✓ Aplicar amostras de soro de pessoas saudáveis ou de pacientes com artrite idiopática juvenil sobre o sistema desenvolvido e avaliar as alterações eletroquímicas e microscópicas decorrentes;
- ✓ Estudar o efeito da variação de diluição das amostras de soro e construir uma curva de calibração;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do biossensor desenvolvido a amostras de diferentes indivíduos saudáveis e pacientes com JIA;
- ✓ Avaliar a estabilidade do sistema desenvolvido por um período de armazenamento.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para o preparo das soluções, foi utilizada água ultrapurificada (Gehaka, resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Antes das leituras eletroquímicas, as soluções foram deaeradas em gás nitrogênio (N_2) por tempo proporcional ao volume (1 min mL^{-1}).

Foram utilizados reagentes segundo as seguintes especificações:

- Ácido perclórico (HClO_4 , Reagen, P.A., 70%, A.C.S.);
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4 , Neon, P.A.);
- Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4 , Neon, P.A., 98%);
- Cloreto de sódio (NaCl , Vetec, P.A.);
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , J.T. Baker, P.A.);
- Cloreto de potássio (KCl , Neon, P.A., A.C.S.);
- Ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Fluka, P.A., A.C.S., 99,5%);
- Ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Acros Organics, P.A., 99%);

As soluções foram preparadas conforme as seguintes especificações:

- **Solução de ácido perclórico (0,5 mol L⁻¹)**: pipetou-se 43,20 mL de HClO_4 concentrado (70%) em um balão volumétrico de 1,00 L e o volume foi completado com água.
- **Solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4)**: foram pesadas 2,74 g de Na_2HPO_4 e 1,160 g de NaH_2PO_4 . As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água autoclavada. O pH da solução foi ajustado para 7,40.
- **Solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) com NaCl (10 mmol L⁻¹)**: foram pesadas 2,74 g de Na_2HPO_4 , 1,160 g de NaH_2PO_4 e 0,1461 g de NaCl . As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água autoclavada. O pH da solução foi ajustado para 7,40.

- **Solução de tampão fosfato salino (1x, pH 7,4):** foram pesados 0,36 g de Na₂HPO₄, 0,06 g de KH₂PO₄, 2 g de NaCl e 0,05 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água autoclavada. O pH da solução foi ajustado para 7,40.
- **Solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L⁻¹), com KCl (0,1 mol L⁻¹):** Pesou-se 0,0075 g de KCl, 0,0016 g de K₃Fe(CN)₆ e 0,0021 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O. As massas foram transferidas para um microtubo e pipetou-se 1 mL de água.
 - **Solução de ferro/ferricianeto de potássio (0,1 mmol L⁻¹), com KCl (1 mmol L⁻¹):** Pesou-se 0,0075 g de KCl, 0,0033 g de K₃Fe(CN)₆ e 0,0042 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O. As massas foram transferidas para um microtubo e pipetou-se 1 mL de água. Em seguida, foi realizada uma diluição de 100 vezes para atingir a concentração de 0,1 mmol L⁻¹.

3.2. Amostras biológicas

O peptídeo PRF+1 (ACSSWLPRGCGGGGS, com amidação C-terminal e ponte dissulfeto nas posições 2-10), selecionado por Araujo et al. (2016), foi sintetizado quimicamente (GenScript) e suas soluções estoque foram preparadas em água deionizada (1 µg mL⁻¹). A solução de bloqueio foram preparadas com albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, 96%) a 3% (m/v) em tampão fosfato salino (PBS 1x, pH 7,4).

As amostras de soro humano foram armazenadas a -20°C e utilizadas sem diluição ou diluídas em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) imediatamente antes do uso. Foram utilizadas amostras de duas pessoas saudáveis (HC, de *healthy control*) e de cinco pacientes com artrite idiopática juvenil (JIA, de *juvenile idiopathic arthritis*), analisadas separadamente. Foram adotados critérios de inclusão e exclusão conforme especificado por Araujo et al. (2016). O uso destas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil (CEP-UFU, número 685/09).

3.3. Eletrodos e potencióstatos

Foram utilizados eletrodos impressos de carbono (SPCE) dos modelos IS-C e DS110, das marcas ItalSens (Palmsens, Países Baixos) e Dropsens (Espanha), respectivamente. Os primeiros foram utilizados nos experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica, enquanto os segundos foram utilizados nos demais experimentos.

Os eletrodos impressos ItalSens IS-C possuíam poliéster como material suporte (10 mm x 8 mm) e a célula eletroquímica consistia em eletrodo de trabalho de carbono (área 7 mm²), contra-eletrodo de carbono e eletrodo pseudo-referência de prata. Os eletrodos impressos Dropsens DS110 possuíam substrato de cerâmica (33 mm x 10 mm) e contatos elétricos de prata. A célula eletroquímica consistia em eletrodo de trabalho de carbono (área 12,56 mm²), contra-eletrodo de carbono e eletrodo pseudo-referência de prata. Os eletrodos foram conectados aos potencióstatos por meio de um adaptador da marca Dropsens.

Para os experimentos eletroquímicos, foi utilizado um potencióstat 760C (CH Instruments, Estados Unidos da América), com a exceção dos experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica, em que foi utilizado um potencióstat PGSTAT302N (Metrohm Autolab, Holanda).

3.4. Limpeza e ativação dos eletrodos impressos

Inicialmente, os eletrodos impressos de carbono foram limpos mecanicamente com um jato de gás nitrogênio (N₂). Em seguida, foram limpos eletroquimicamente, por voltametria cíclica em solução de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹, com faixa de potencial de 0 a +0,8 V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Após a limpeza dos eletrodos, foram avaliados técnicas e parâmetros para ativação da superfície, preservando as características dos eletrodos e facilitando o posterior recebimento da sonda PRF+1. Os métodos e parâmetros utilizados estão listados na **tabela 1**.

Imediatamente após a aplicação de cada um desses métodos, foram realizadas voltametrias cíclicas em solução do par redox ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L⁻¹) com KCl (0,1 mol L⁻¹), a fim de comparar os efeitos dos métodos sobre a superfície dos eletrodos. Foi utilizada faixa de potencial -0,5 a 0,8

V e velocidade 50 mV s⁻¹. Conforme discutido posteriormente, o método cronoamperométrico (M3) foi selecionado para os experimentos seguintes.

Tabela 1. Métodos e parâmetros avaliados para ativação da superfície dos eletrodos.

Método	Técnica	Parâmetros	Referência
M0	Nenhuma		
M1	Voltametria cíclica	-0,6 a +1,6 V; 0,1 V.s ⁻¹	(SENTHILKUMAR et al., 2015)
M2	Voltametria cíclica	-0,8 a +1,2 V; 0,1 V.s ⁻¹	(SENTHILKUMAR et al., 2015)
M3	Cronoamperometria	-1,4 V; 300 s	(SAHIN; AYRANCI, 2015)

3.5. Preparo do biossensor

Imediatamente após a ativação dos eletrodos impressos por cronoamperometria, a solução do peptídeo PRF+1 (1 µg mL⁻¹) foi gotejada sobre os eletrodos impressos de carbono e assim mantida à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, os eletrodos foram lavados com tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) contendo NaCl (10 mmol L⁻¹). O sistema contendo o eletrodo impresso de carbono e o peptídeo PRF+1 imobilizado foi identificado como SPCE/PRF+1.

Em seguida, foi gotejada a solução de bloqueio (BSA 3%) sobre o sistema SPCE/PRF+1 e assim mantida à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, os eletrodos foram lavados com tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) contendo NaCl (10 mmol L⁻¹). O sistema contendo o eletrodo impresso de carbono, o peptídeo PRF+1 e a molécula de bloqueio BSA foi identificado como SPCE/PRF+1/BSA.

3.6. Aplicação das amostras de soro

As amostras de soro de pacientes diagnosticados com artrite idiopática juvenil e indivíduos saudáveis foram aplicadas individualmente sobre o sistema SPCE/PRF+1/BSA, com volume de 2 µL. Em seguida, foram mantidas em contanto

com o sistema durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, os eletrodos foram lavados com tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) contendo NaCl (10 mmol L^{-1}). O sistema que recebeu amostras de soro de pacientes com JIA foi identificado como SPCE/PRF+1/BSA/JIA, enquanto o que recebeu amostra de soro de controles saudáveis foi identificado como SPCE/PRF+1/BSA/HC. Após a lavagem, os sistemas foram imediatamente submetidos à detecção eletroquímica.

A **figura 11** ilustra esquematicamente as etapas de preparo do biossensor e aplicação da amostra de soro positivo.

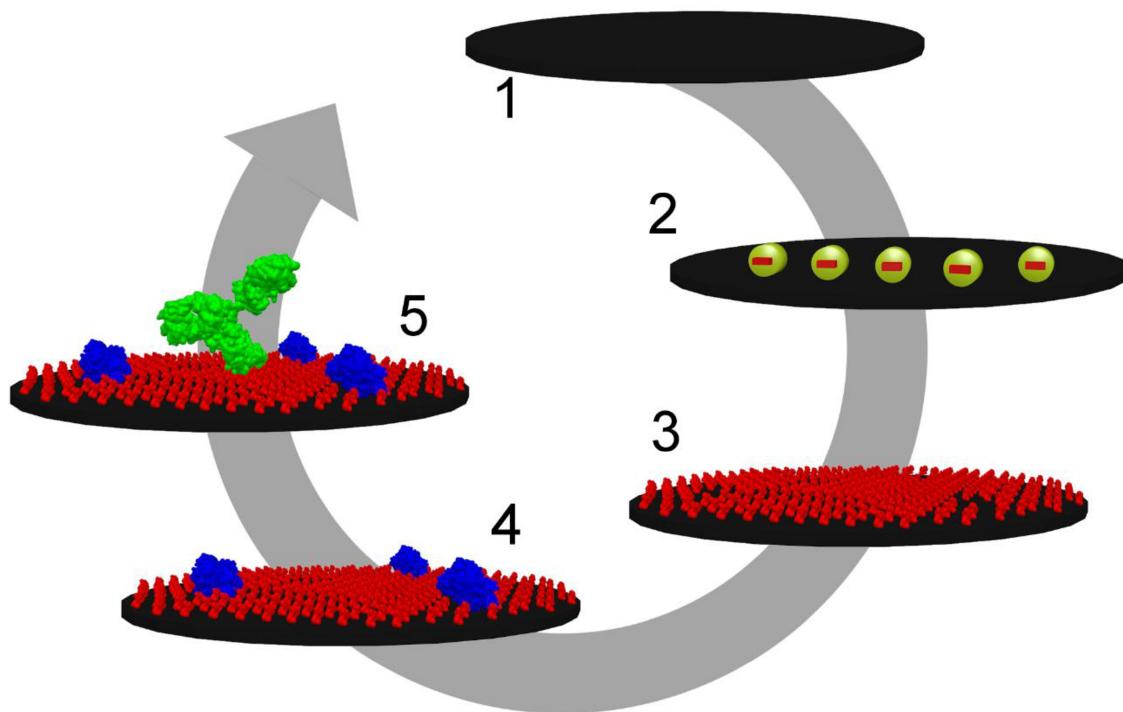


Figura 11. Esquema ilustrativo das modificações que ocorrem na superfície durante as etapas de preparo do biossensor e aplicação do alvo. 1) Eletrodo impresso de carbono (SPCE) limpo. 2) SPCE após a ativação da superfície pelo método cronoamperométrico, com a representação das cargas negativas. 3) Imobilização do peptídeo sobre os eletrodos ativados (SPCE/PRF+1). 4) Etapa de bloqueio (SPCE/PRF+1/BSA). 5) Aplicação de amostras de soro positivas, contendo o alvo (SPCE/PRF+1/BSA/JIA), com destaque para a interação peptídeo-anticorpo (Fonte: autoria própria).

3.7. Detecções eletroquímicas

Os sistemas identificados como SPCE, SPCE/PRF+1, SPCE/PRF+1/BSA, SPCE/PRF+1/BSA/HC e SPCE/PRF+1/BSA/JIA foram detectados por voltametria de pulso diferencial em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) ou solução de

ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e KCl (1 mmol L^{-1}). Para a primeira solução, foi aplicada a faixa de potencial $+0,2$ a $+1,0 \text{ V}$, velocidade de varredura 40 mV s^{-1} e as amostras de soro foram utilizadas em diluição 1:100. Para a segunda solução, foi aplicada a faixa de potencial $-0,2$ a $+0,5 \text{ V}$ e velocidade de 40 mV s^{-1} e as amostras de soro foram utilizadas sem diluição.

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas para os sistemas SPCE/PRF+1/BSA, SPCE/PRF+1/BSA/HC e SPCE/PRF+1/BSA/JIA em solução aquosa de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L^{-1}) e KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), com potencial de circuito aberto, faixa de frequência de 100 kHz a 10 mHz e amplitude de 10 mV . As amostras de soro foram utilizadas em diluição 1:100 e o circuito equivalente apropriado foi construído com o software provido pelo equipamento (Nova 1.10).

3.8. Teste da sensibilidade do biossensor usando amostra real

A resposta do biossensor foi avaliada em função da variação de concentração do analito, presente na amostra de soro de um paciente com JIA. Para tal, foi conduzida voltametria de pulso diferencial em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) contendo KCl (1 mmol L^{-1}). As amostras de soro positivas foram utilizadas sem diluição ou diluídas 10, 25, 35, 50, 100 ou 300 vezes em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) com NaCl (10 mmol L^{-1}).

A sensibilidade foi calculada como o coeficiente angular da reta (m). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados segundo as **equações 1 e 2**.

$$LD = (3 * DP_{\alpha})/m \quad \text{Equação 10}$$

$$LQ = (10 * DP_{\alpha})/m \quad \text{Equação 11}$$

Nestas equações, DP_{α} é o desvio-padrão do branco e m é o coeficiente angular da reta correspondente à curva de calibração (JUSTINO et al., 2010).

3.9. Teste com amostras de diferentes pacientes

O biosensor também foi aplicado em testes envolvendo amostras de diferentes pacientes com JIA e HC. Para tal, sua resposta eletroquímica após interação com amostras positivas ou negativas foi avaliada em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) contendo KCl (1 mmol L^{-1}), por voltametria de pulso diferencial. Foram testadas amostras de duas pessoas saudáveis (HC1 e HC2) e de cinco pacientes positivos (JIA1, JIA2, JIA3, JIA4 e JIA5). As amostras de soro foram utilizadas sem diluição.

3.10. Teste de estabilidade

A fim de estudar o comportamento do biosensor frente ao armazenamento, sua resposta eletroquímica após interação com amostras positivas foi avaliada periodicamente em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) contendo KCl (1 mmol L^{-1}), por voltametria de pulso diferencial. Seguindo a primeira leitura (dia zero), foram feitas novas leituras após 5, 10, 20, 30 e 40 dias. O armazenamento foi realizado a 8°C , em recipientes fechados e secos. As amostras de soro foram utilizadas sem diluição.

3.11. Microscopia de força atômica

O aspecto morfológico da superfície dos eletrodos após cada etapa de modificação foi avaliado por microscopia de força atômica, utilizando um microscópio Shimadzu SPM-9600 e ponteiras de silício com constante de mola na faixa de 10 a 130 N m^{-1} e frequência de ressonância entre 204 e 497 kHz. As leituras foram realizadas no modo de não-contato, com frequência de oscilação entre 298 e 322 kHz. As amostras de soro foram utilizadas sem diluição.

3.12. Análises de Bioinformática

O ponto isoeletíco teórico do peptídeo PRF+1 foi predito pela ferramenta Pep-Calc.com (LEAR; COBB, 2016), que permite a inserção de peptídeos com modificações N e C-terminais. A estrutura tridimensional do peptídeo foi predita pelo

método *ab initio*, utilizando a fermenta I-Tasser (YANG et al., 2015). Em seguida, a minimização de energia e equilíbrio foram simulados a 25°C utilizando as ferramentas VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e NAMD (PHILLIPS et al., 2005).

3.13. Estatística e tratamento dos dados

A não ser que especificado de outra forma, todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados numéricos foram apresentados no formato média aritmética \pm desvio-padrão. Apenas desvios-padrão inferiores a 10% da média foram considerados aceitáveis.

Quando aplicável, os voltamogramas finais foram subtraídos de suas respectivas linhas de base (voltamogramas obtidos nas mesmas condições, em eletrólito suporte). Os picos foram corrigidos pela subtração de uma linha reta tangente à base, alinhados verticalmente e suas características (área e altura) foram calculadas pela ferramenta *Peak Analyzer*, incluída no software Origin 8. A variação de corrente de pico (Δi_p) foi obtida pela altura calculada nos gráficos de corrente por potencial elétrico e a carga (Q) foi obtida pela área sobre a curva calculada nos gráficos de corrente por tempo.

Os voltamogramas, cronoamperogramas e espectros foram construídos por meio do software Origin 8, enquanto os gráficos de barras e demais curvas foram construídos com o GraphPad Prism 6. As microscopias de força atômica foram representadas e analisadas por meio do software Gwyddion 2.45.

4. Resultados e Discussão

4.1. Limpeza e ativação dos eletrodos impressos

Os perfis eletroquímicos obtidos para a limpeza e a ativação dos eletrodos impressos pelo método cronoamperométrico são apresentados na **figura 12**.

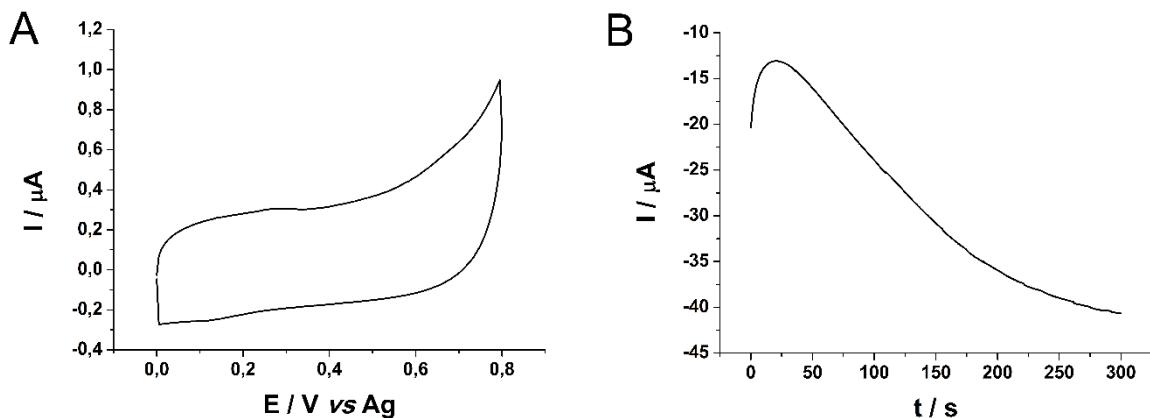


Figura 12. Perfis eletroquímicos obtidos para a limpeza e para a ativação dos eletrodos impressos pelo método M3. A) Voltamograma cíclico em solução de ácido perclórico, realizado na faixa de 0,0 a +0,8 V, 50 mV s⁻¹. B) Cronoamperograma em solução tampão fosfato com NaCl, realizado com potencial -1,4 V por 300 s.

O perfil eletroquímico em ácido perclórico (**figura 12A**) foi resultante da limpeza eletroquímica dos eletrodos, em preparação para os experimentos seguintes e também serviu como padrão para os eletrodos para assegurar uma melhor reprodutibilidade dos resultados com o biossensor produzido. O perfil da cronoamperometria (**figura 12B**) mostra o característico descréscimo de corrente ao longo do tempo, enquanto é acumulada carga negativa na superfície do eletrodo.

Contudo, antes da adoção da cronoamperometria como método de ativação, outras possibilidades foram testadas. Após a aplicação de cada um dos possíveis métodos de ativação nos eletrodos impressos de carbono (SPCE), incluindo o método cronoamperométrico (M3), foram realizadas voltametrias cíclicas em solução de ferro/ferricianeto de potássio para comparar seus efeitos sobre a superfície dos eletrodos. Os voltamogramas são apresentados na **Figura 13**.

Os eletrodos impressos que não passaram por nenhum método de ativação (M0) apresentaram o perfil típico em solução de ferro/ferricianeto de potássio, com picos de oxidação ($E_{pa} = +0,19$ V) e redução ($E_{pc} = +0,03$ V) bem definidos.

Em geral, os eletrodos ativados com os métodos voltamétricos M1 e M2 apresentaram deslocamento significativo no valor dos potenciais de pico e diminuição da intensidade das correntes de pico. Como o E_{pa} aumentou e o E_{pc} diminuiu, a ativação dificultou a transferência eletrônica, possivelmente devido à formação de grupos oxidados e/ou reduzidos na superfície do eletrodo, que bloquearam em parte o fluxo de elétrons π pela estrutura do carbono grafite (GURZEDA et al., 2016).

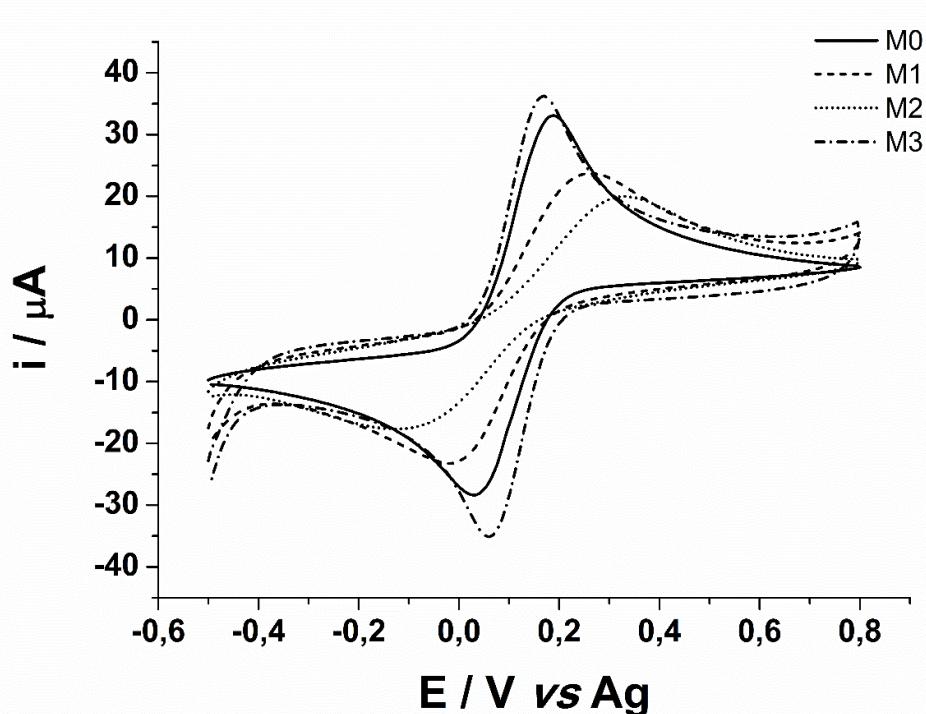


Figura 13. Voltamogramas cílicos realizados em solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L⁻¹) e KCl (0,1 mol L⁻¹), com faixa de potencial de -0,5 a 0,8 V, 50 mV s⁻¹. Os diferentes métodos testados para ativação foram: M0, ausência de tratamento; M1 e M2, voltametrias cílicas; M3, cronoamperometria. Os parâmetros de cada método estão listados na Tabela 1.

Por outro lado, o método M3 teve um efeito contrário, com um deslocamento de potencial menos significativo e pequeno aumento da intensidade de corrente de picos, sugerindo que a utilização deste método de ativação não prejudicou a

transferência eletrônica entre o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e a superfície dos eletrodos.

Assim, o método M3 foi escolhido, já que o perfil eletroquímico dos eletrodos tratados sugere menos alterações na estrutura do eletrodo, sem prejuízos à transferência eletrônica. Outros pontos importantes deste método são a excelente reproducibilidade obtida e a possibilidade de interação eletrostática com a sonda peptídica a ser imobilizada.

Além disso, a predição teórica do ponto isoelétrico (pl) do peptídeo PRF+1 foi de 8,49. Como as soluções de imobilização e lavagem possuíam valores de pH abaixo do pl, a carga líquida do peptídeo era positiva, podendo interagir com a superfície do eletrodo impresso carregada negativamente pelo método M3.

4.2. Imobilização do peptídeo PRF+1

Para investigar a modificação dos SPCE com o peptídeo PRF+1, foram realizadas voltametrias em diferentes eletrólitos, bem como análises da topografia da superfície por microscopia de força atômica. Na **figura 14**, são apresentadas voltametrias de pulso diferencial realizadas em tampão fosfato.

Entre os 20 aminoácidos que constituem peptídeos e proteínas, foi reportado que cinco são oxidáveis em eletrodos de carbono: metionina, tirosina, histidina, triptofano e cisteína (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013). Destes, apenas os dois últimos estão presentes na sequência de PRF+1. A **figura 15** apresenta sua estrutura tridimensional, predita por métodos *ab initio*, após minimização de energia e equilíbrio a 25°C.

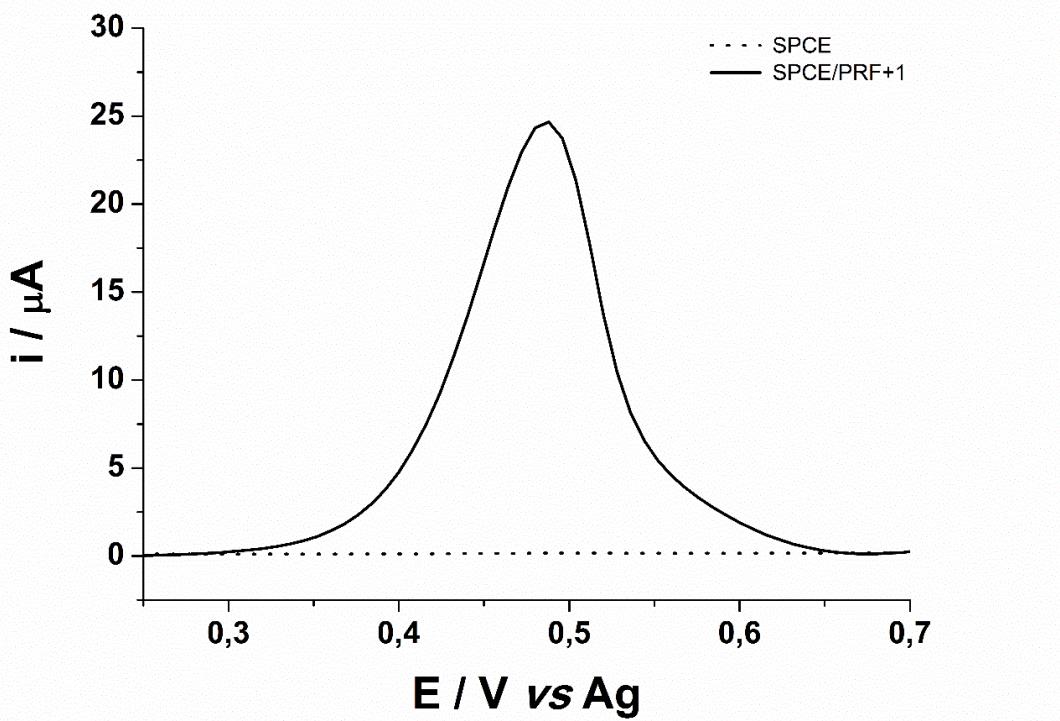


Figura 14. Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos impressos de carbono sem modificação (SPCE) e modificados com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Solução: tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4); velocidade: 40 mV s⁻¹.

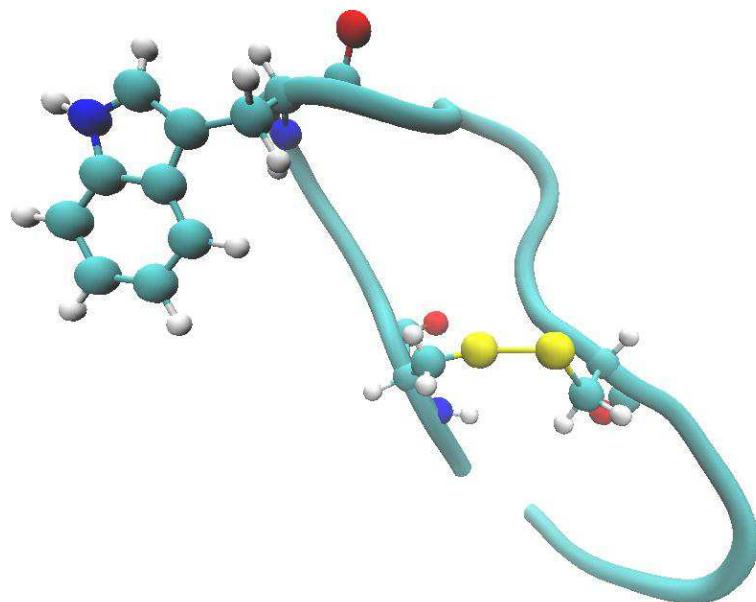


Figura 15. Estrutura tridimensional do peptídeo PRF+1 (ACSSWLPRGCGGGS), representada na forma de *cartoon*, com os resíduos de aminoácidos oxidáveis destacados.

A predição da estrutura do peptídeo, aliada à especificação técnica da inclusão de pontes dissulfeto após a síntese, mostra que os dois resíduos de cisteína estão presentes na forma de cistina. A cistina corresponde ao estado já oxidado destes aminoácidos, em que são ligados por uma ponte dissulfeto (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011a). Assim, é provável que o pico detectado corresponda à oxidação do resíduo de triptofano presente no peptídeo. Em eletrodos de carbono vítreo, o triptofano foi detectado em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,0) com $E_p = +0,64$ V (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011b). Porém, o potencial de pico varia conforme a superfície de imobilização, o pH do sistema e outros fatores.

Além da detecção direta em tampão fosfato, foi realizada a voltametria de pulso diferencial em solução de ferro/ferricianeto de potássio, com KCl como eletrólito suporte. Os voltamogramas são apresentados na **figura 16**.

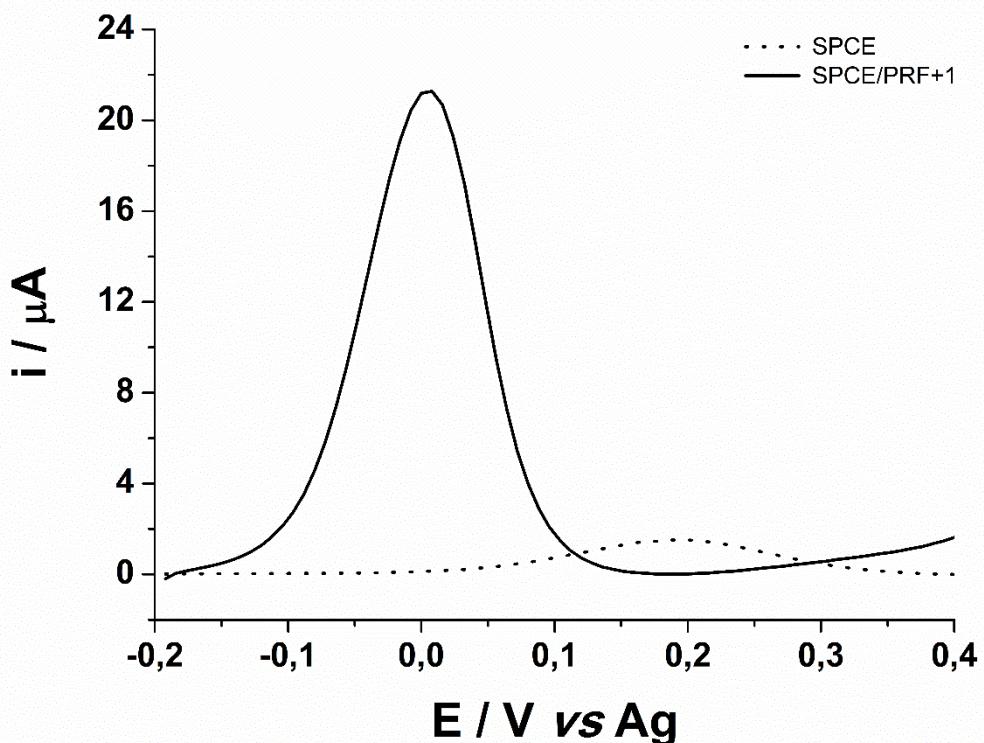


Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos impressos de carbono sem modificação (SPCE) e modificados com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Eletrólito: ferro/ferricianeto de potássio (0,1 mmol L⁻¹) e KCl (1 mmol L⁻¹), velocidade: 40 mV s⁻¹.

Para os eletrodos sem modificação (SPCE), os voltamogramas apresentaram um pico de oxidação em $E_p = +0,19$ V e $\Delta i_p = 1,41 \pm 0,12$ μ A. Já para os eletrodos modificados com o peptídeo (SPCE/PRF+1), os voltamogramas apresentaram pico de oxidação em $E_p = +0,01$ V e $\Delta i_p = 21,588 \pm 0,427$ μ A.

Neste caso, os picos detectados correspondem à oxidação do íon ferrocianeto ($Fe(CN)_6^{4-}$), uma molécula redox usada para investigar as sucessivas modificações da superfície dos eletrodos. A **equação 12** elucida como ocorre esse processo de oxirredução.



Equação 12

Em eletrodos de grafite, este íon apresenta potencial de pico de oxidação próximo a +0,2 V vs. Ag/AgCl (FERREIRA et al., 2011), o que está de acordo com os resultados obtidos para o eletrodo impresso sem modificação. Contudo, no caso do eletrodo modificado com o peptídeo, há um deslocamento do pico de oxidação para um potencial mais catódico ($E_p = +0,01$ V) e um aumento da intensidade da corrente de pico em cerca de 15 vezes.

Estas observações sugerem que a modificação da superfície com PRF+1 facilita a transferência eletrônica do íon $Fe(CN)_6^{4-}$ para o eletrodo. Além disso, sugere-se a existência de uma atração eletrostática entre a molécula redox (carga líquida negativa) e o peptídeo imobilizado na superfície (carga líquida positiva). Esta sugestão é coerente com a predição teórica do ponto isoelétrico do peptídeo ($pI = 8,49$), que indica uma carga líquida positiva do peptídeo.

Por fim, a **figura 17** apresenta as microscopias de força atômica para os eletrodos impressos antes e após a modificação com PRF+1.

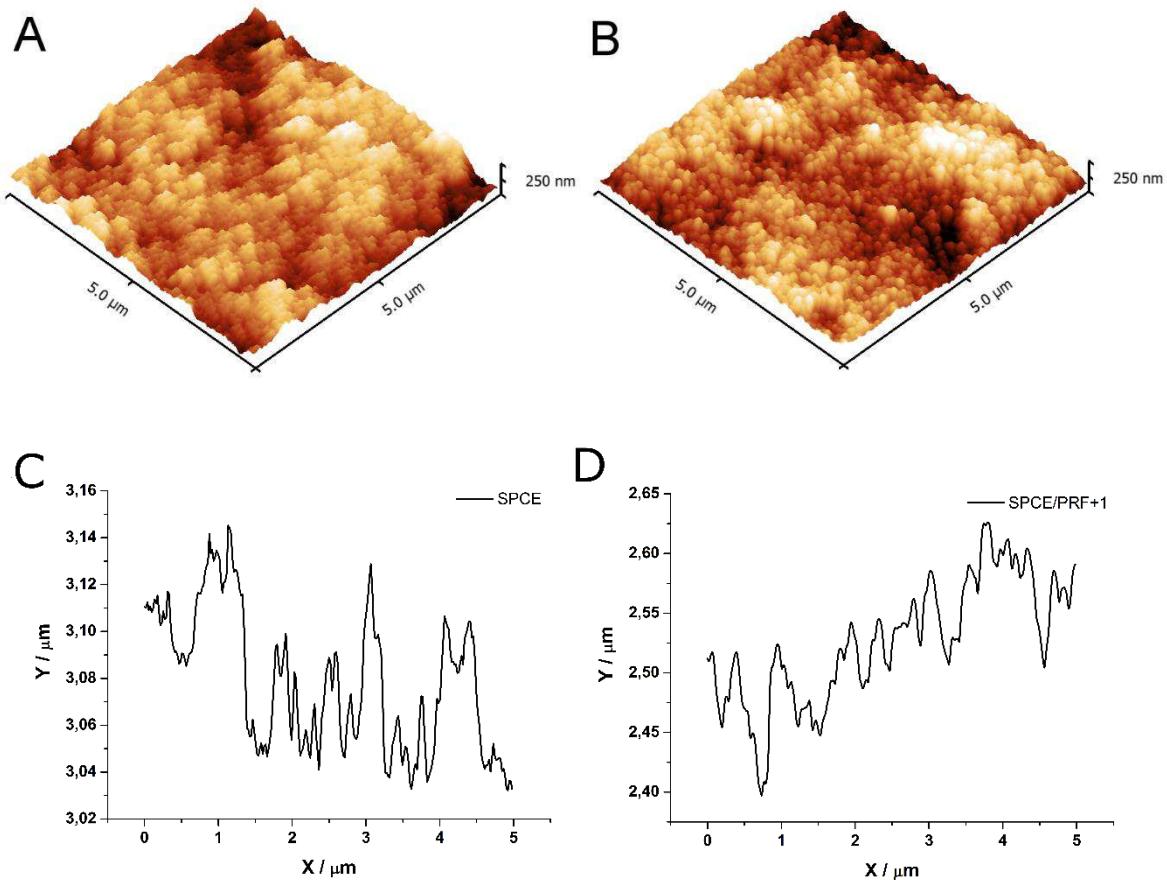


Figura 17. Microscopias de força atômica A) do eletrodo sem modificação (SPCE) e B) modificado com o peptídeo (SPCE/PRF+1). Perfis laterais C) do eletrodo sem modificação (SPCE) e D) modificado com o peptídeo (SPCE/PRF+1). As medidas foram realizadas no modo não-contato.

Pode ser observado que a imobilização do peptídeo produz uma alteração na altura e tamanho dos *clusters* quando comparado ao eletrodo sem biomolécula. Os eletrodos sem modificação (SPCE) apresentaram um aspecto rugoso, próprio do grafite, com $R_q = 30,16 \pm 1,45$ nm (figura 17A). Já o sistema SPCE/PRF+1 apresentou agregados globulares do peptídeo uniformemente distribuídos pela superfície, com $R_q = 25,18 \pm 0,69$ nm (figura 17B). Os perfis laterais extraídos das imagens obtidas (figuras 17C e 17D) confirmam a alteração morfológica.

A diminuição dos valores de rugosidade dos eletrodos modificados com o peptídeo, quando comparados aos eletrodos sem modificação, está de acordo com a cobertura homogênea da superfície pelo peptídeo, que pode ocupar vales e picos presentes na superfície do eletrodo, diminuindo discretamente suas irregularidades. Esta mudança da topografia da superfície tendendo à

uniformização após a adição de um peptídeo está em consonância com dados da literatura científica (ARYA et al., 2014).

Os resultados obtidos sugerem que a imobilização é realizada via interações eletrostáticas, já que o eletrodo possuía carga negativa após a ativação por cronoamperometria e o peptídeo PRF+1 possuía carga positiva na solução de imobilização. Assim, o resíduo de arginina (R) presente no peptídeo é especialmente importante para a imobilização. É possível que as interações de van der Waals também sejam importantes para a adsorção física de PRF+1 em SPCE.

Em conjunto, estes resultados mostram que o peptídeo PRF+1 foi eficientemente imobilizado sobre a superfície dos eletrodos impressos de carbono. Assim, a ativação dos eletrodos foi adequada para promover a fixação do peptídeo no sistema SPCE/PRF+1, mesmo após as lavagens realizadas. E a electroatividade própria do peptídeo, bem como o uso de sondas redox possibilitaram a investigação desta superfície e comprovação de sua modificação.

4.3. Detecção do alvo em amostras de soro humano

Após a imobilização do peptídeo, os eletrodos impressos foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA) e incubados com as amostras de soro de pessoas saudáveis (HC) ou de pacientes com artrite idiopática juvenil (JIA). Posteriormente, a detecção foi realizada por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Os resultados estão apresentados na **figura 18**.

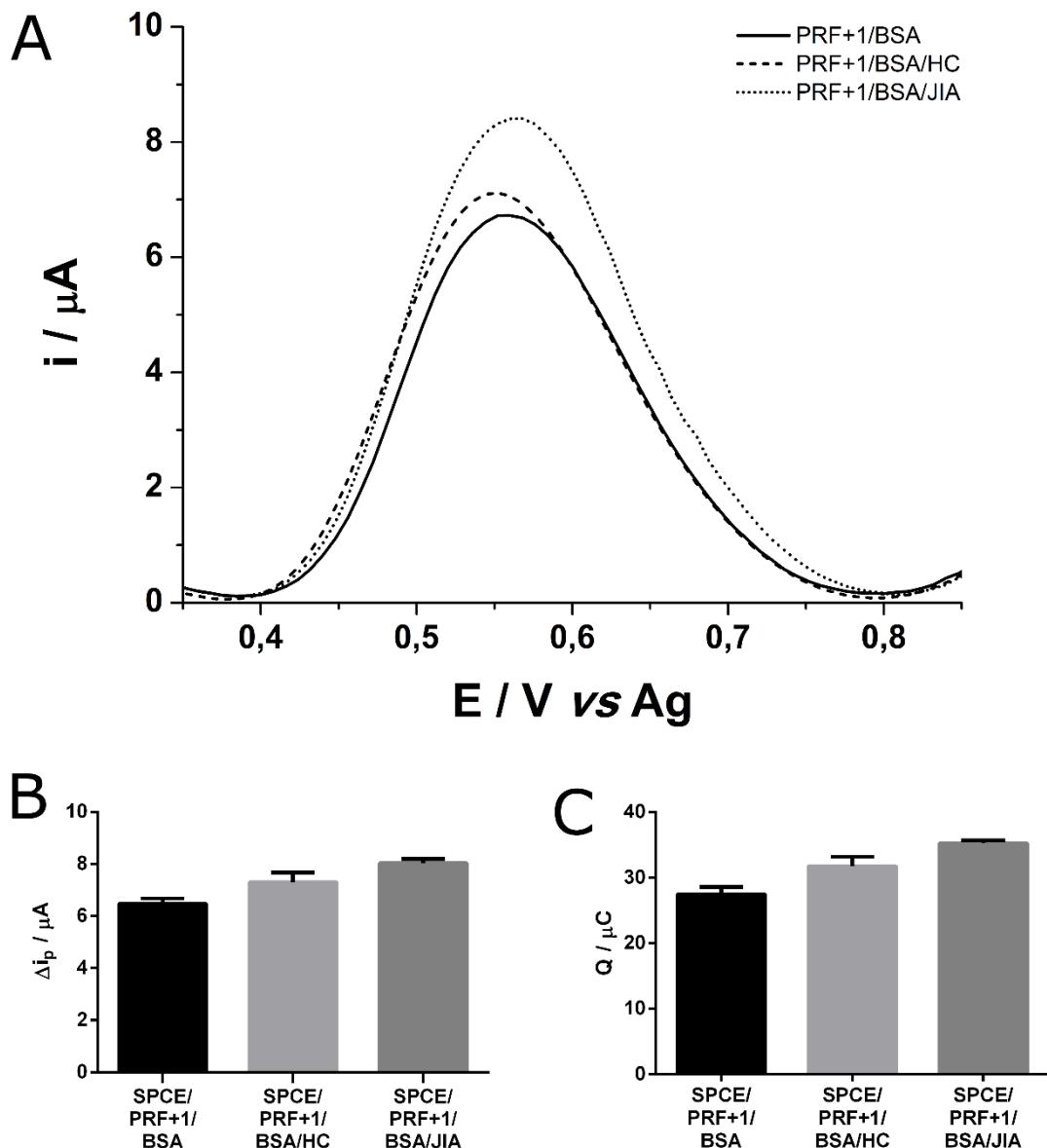


Figura 18. Resposta eletroquímica do sistema SPCE/PRF+1/BSA em tampão fosfato antes e após a incubação com as diferentes amostras de soro (HC e JIA). A) Voltamogramas de pulso diferencial realizados em solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), com velocidade 40 mV s⁻¹. Gráficos de barras B) de corrente de pico e C) quantidade de carga para os diferentes sistemas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação em $E_p = + 0,56$ V e $\Delta i_p = 6,473 \pm 0,209$ μA . Além disso, o valor de carga foi calculado como $Q = 27,482 \pm 1,071$ μC . Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA/HC, houve pico de oxidação em $E_p = + 0,55$ V, com $\Delta i_p = 7,306 \pm 0,368$ μA e $Q = 31,781 \pm 1,419$ μC . Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA, houve pico de oxidação em $E_p = + 0,56$ V, com $\Delta i_p = 8,025 \pm 0,180$ μA e $Q = 35,296 \pm 0,377$ μC .

Em relação ao sistema SPCE/PRF+1 (**figura 14**), no sistema SPCE/PRF+1/BSA (**figura 18A**), houve a diminuição da intensidade de corrente elétrica e um deslocamento para um potencial de pico de oxidação mais anódico (de +0,49 V para + 0,56 V), o que sugere que o bloqueio com BSA dificulta a transferência eletrônica. A albumina apresenta $pI = 4,8$ (FEARS, 2014), tendo carga líquida negativa em tampão fosfato ($pH = 7,4$). Esta carga negativa resulta em repulsão por alguns íons da solução, como o íon fosfato, dificultando a transferência eletrônica.

Também é importante destacar que a BSA (aproximadamente 69,29 kDa) é relativamente maior, se comparada ao peptídeo PRF+1 (aproximadamente 1,33 kDa). Assim, existe a possibilidade de impedimento estérico para a ligação de PRF+1 ao seu alvo, devido à etapa de bloqueio. Contudo, a combinação de parâmetros como a concentração de BSA, o tempo de bloqueio e parâmetros relacionados à imobilização do peptídeo auxiliam na minimização destes problemas.

A comparação do sistema SPCE/PRF+1/BSA com aqueles em que houve incubação com soro, tanto pela análise da corrente de pico (**figura 18B**), quanto pela análise de quantidade de carga (**figura 18C**), mostra que houve discriminação entre estes grupos. O aumento da corrente de pico para o sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA, em relação aos demais, pode ser justificado pela interação da sonda com o alvo específico, uma imunoglobulina G (IgG), que disponibiliza mais aminoácidos passíveis de serem oxidados junto à superfície do eletrodo. Uma vez formado, o complexo peptídeo-anticorpo é mantido por interações como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e/ou de van der Waals (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012).

A detecção com amostras de soro também foi realizada em solução de ferro/ferricianeto de potássio, por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Os resultados estão apresentados na **Figura 19**.

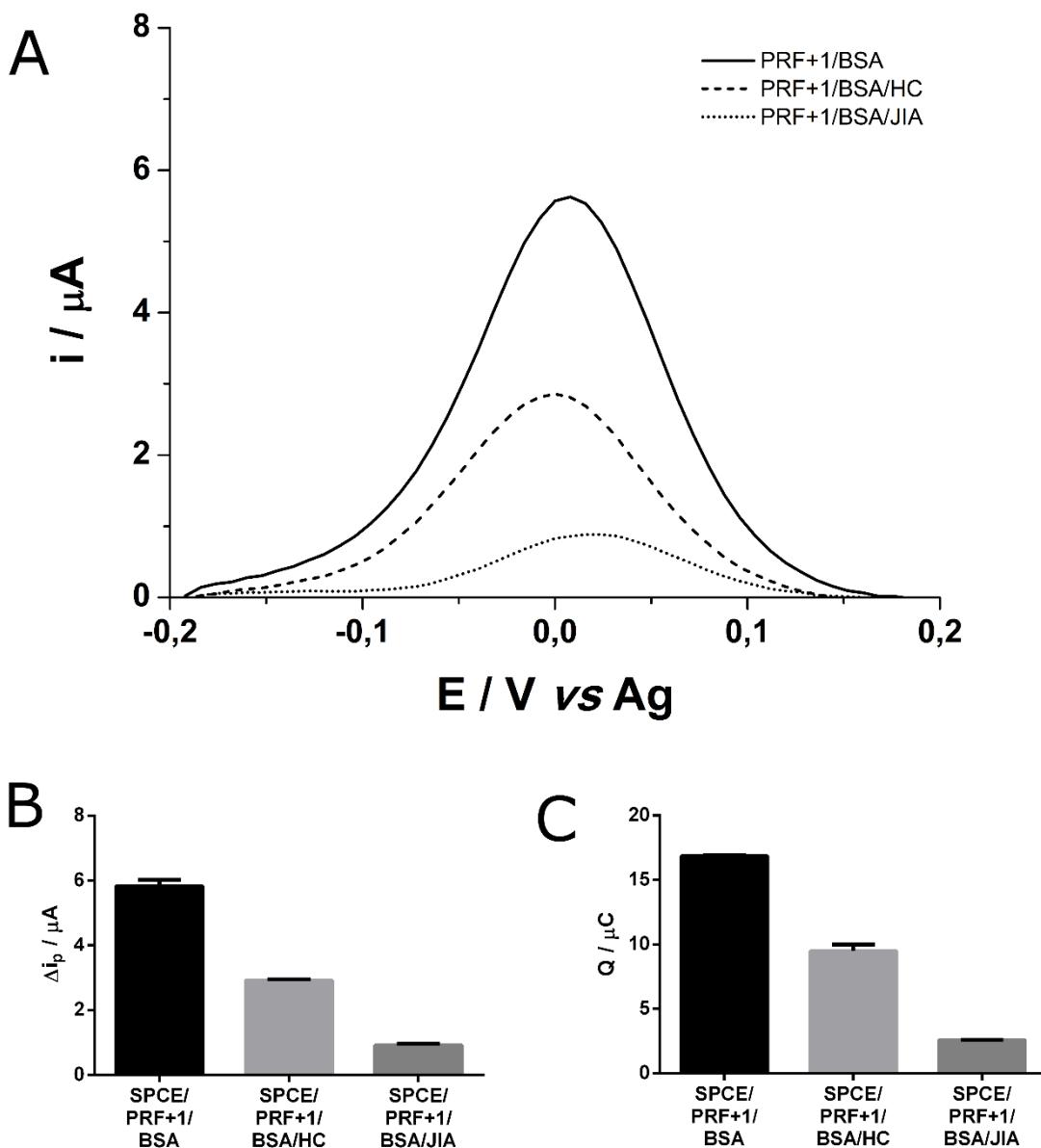


Figura 19. Resposta eletroquímica do sistema SPCE/PRF+1/BSA em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e KCl (1 mmol L^{-1}), antes e após a incubação com as diferentes amostras de soro (HC e JIA). A) Voltamogramas de pulso diferencial, velocidade: 40 mV s^{-1} . Gráficos de barras das respostas de B) corrente de pico e C) quantidade de carga para os diferentes sistemas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação com $E_p = +0,01 \text{ V}$, $\Delta i_p = 5,823 \pm 0,196 \mu\text{A}$ e $Q = 16,85 \pm 0,073 \mu\text{C}$. Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA/HC, houve pico de oxidação em $E_p = 0 \text{ V}$, com $\Delta i_p = 2,911 \pm 0,034 \mu\text{A}$ e $Q = 9,468 \pm 0,501 \mu\text{C}$. Para o sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA,

houve pico de oxidação em $E_p = +0,02$ V, com $\Delta i_p = 0,918 \pm 0,0489$ μ A e $Q = 2,572 \pm 0,024$ μ C.

Comparando os sistemas SPCE/PRF+1 (**figura 16**) e SPCE/PRF+1/BSA (**figura 19A**), nota-se uma significativa diminuição de corrente de pico (queda de 73,0%). Em relação a SPCE/PRF+1/BSA, os sistemas SPCE/PRF+1/BSA/HC e SPCE/PRF+1/BSA/JIA apresentaram quedas de 50,0% e 84,2% na amplitude de sinal corrente de pico, respectivamente. Por fim, em relação a SPCE/PRF+1/BSA/HC, o sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA apresentou uma resposta de corrente de pico significativamente menor (queda de 68,5%).

Tais observações podem ser justificadas pelos fenômenos que acontecem na interface eletrodo modificado-solução. A adição de BSA (no sistema SPCE/PRF+1/BSA) e a ligação do alvo à sonda (no sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA) correspondem à formação de camadas que bloqueiam fisicamente a superfície do eletrodo, diminuindo a difusão dos íons $Fe(CN)_6^{4-}$. Consequentemente, a adição das sucessivas camadas à superfície diminui a resposta de corrente e a quantidade de carga. Além disso, provoca um aumento na resistência à transferência eletrônica, visto que há um deslocamento para potenciais mais anódicos (HENNESSEY et al., 2009).

No caso do sistema SPCE/PRF+1/BSA/HC, a diminuição da corrente de pico em relação a SPCE/PRF+1/BSA pode ser indicativo de que as amostras de soro, ainda que de pessoas saudáveis, contenham moléculas que possam interagir com o BSA usado para bloqueio, o que seria coerente com o papel biológico de transporte das albuminas séricas. Neste caso, estas moléculas poderiam representar uma camada extra que diminuiria a difusão dos íons $Fe(CN)_6^{4-}$ para o eletrodo modificado. Entretanto, a biomolécula-alvo específica, presente nas amostras positivas, é mais eficiente neste aspecto, o que resulta em diminuição mais acentuada da amplitude de corrente de pico e da quantidade de carga. Assim, este método de detecção foi eficaz para discriminar as amostras positivas e negativas, seja pelo monitoramento da corrente de pico (**figura 19B**) ou pela carga (**figura 19C**).

A discriminação entre as amostras de soro também foi analisada por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica, cujos resultados estão apresentados na **figura 20**.

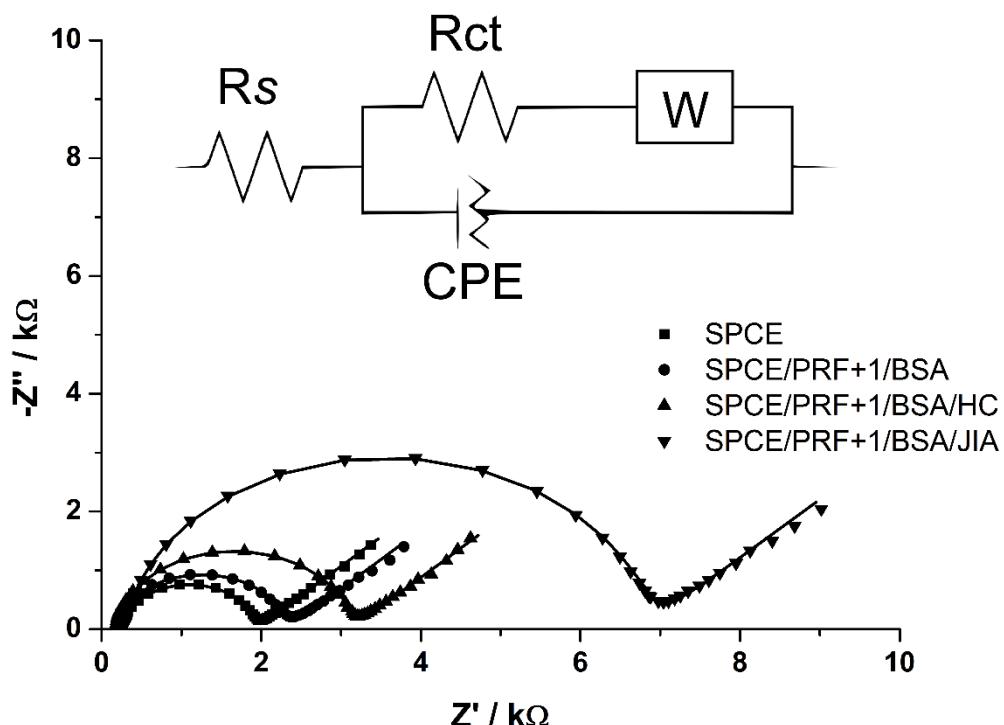


Figura 20. Diagramas de Nyquist obtidos na espectroscopia de impedância em solução de ferro/ferricianeto de potássio (5 mmol L^{-1}) e KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), para os sistemas SPCE e SPCE/PRF+1/BSA antes e após a aplicação de amostras de soro positivo (JIA) e negativo (HC). As linhas cheias (-) correspondem à simulação para o circuito equivalente representado acima. Parâmetros: faixa de frequência de 100 kHz a 10 mHz , amplitude de 10 mV e potencial de circuito aberto. Foram utilizadas amostras de um indivíduo para cada grupo experimental e o ensaio foi conduzido em duplicata.

Os dados experimentais obtidos na espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizados para a modelagem de um circuito equivalente, que reflete os fenômenos que ocorrem na célula eletroquímica. O modelo obtido corresponde ao circuito equivalente de Randles (BARD; FAULKNER, 2000; BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008), com os seguintes componentes: R_s , a resistência da solução entre os eletrodos; R_{ct} , a resistência à transferência de carga, que se refere à interação do composto redox com a superfície do eletrodo; e W , a impedância de Warburg, relativa à difusão das espécies eletroativas que participam do fenômeno estudado. O circuito equivalente de Randles também possui um

componente de capacidade (C_{DL}) entre os eletrodos e os íons carregados na solução, isto é, a dupla camada. Contudo, neste modelo, este componente foi substituído por um elemento de fase constante (Q), normalmente relacionado a fatores como a rugosidade da superfície, distribuição não uniforme de corrente e diferentes taxas de reação. O circuito obtido apresentou um valor de χ^2 (qui-quadrado) adequado, da ordem de 10^{-3} , demonstrando que representa bem a realidade do sistema eletroquímico.

Quando o eletrodo de grafite foi sensibilizado com o peptídeo, na ausência ou presença do soro negativo ou positivo, a cinética de transferência de elétrons foi perturbada e observou-se o aparecimento de um semicírculo, resultante do bloqueio à difusão da espécie eletroativa, promovido pela deposição das camadas de biomoléculas.

A ligação entre o peptídeo e a IgG foi evidenciada pelo aumento observado na resistência à transferência de carga promovida pela presença da amostra de soro positiva para JIA. Os resultados de impedância obtidos indicam que na presença da imunoglobulina G, pode ser formado um material mais sólido sobre a superfície do sensor, resultando em um aumento na resistência, o que é compatível com a formação do complexo peptídeo/anticorpo.

Não foi observada uma variação significativa na resistência à transferência de carga quando o biossensor foi analisado na presença do soro negativo (HC).

Os valores de resistência à transferência de carga (R_{CT}) obtidos na simulação foram utilizados para analisar os diferentes grupos experimentais e estão apresentados na forma de gráfico de barras na **figura 21**.

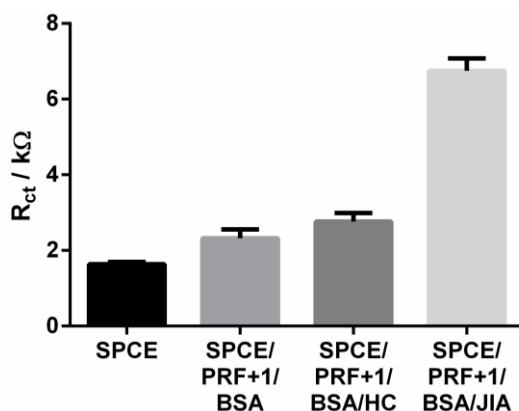


Figura 21. Gráfico de barras representando os valores de resistência à transferência de carga (R_{CT}) obtidos por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica para os diferentes grupos experimentais. Foram utilizadas amostras de um indivíduo para cada grupo experimental e o ensaio foi conduzido em duplicata.

Os valores de resistência à transferência de carga foram de $1,64 \pm 0,061$ k Ω para o sistema SPCE, $2,33 \pm 0,23335$ k Ω para o sistema SPCE/PRF+1/BSA, $2,76 \pm 0,22$ k Ω para SPCE/PRF+1/BSA/HC e $6,75 \pm 0,33$ k Ω para SPCE/PRF+1/BSA/JIA.

Enquanto o sistema em que foi aplicado o soro de um indivíduo saudável (SPCE/PRF+1/BSA/HC) apresentou valores de resistência próximos ao do branco (SPCE/PRF+1/BSA), no sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA houve um aumento de resistência de cerca de 3 vezes, em comparação com o branco. Este aumento nos valores de R_{CT} , após a ligação do alvo, pode ser resultado da obstrução da reação de transferência eletrônica entre a molécula redox e a superfície do eletrodo modificado.

A **figura 22** apresenta as imagens de microscopia de força atômica para os três sistemas, destacando o aspecto morfológico das superfícies antes e após a adição das amostras de soro.

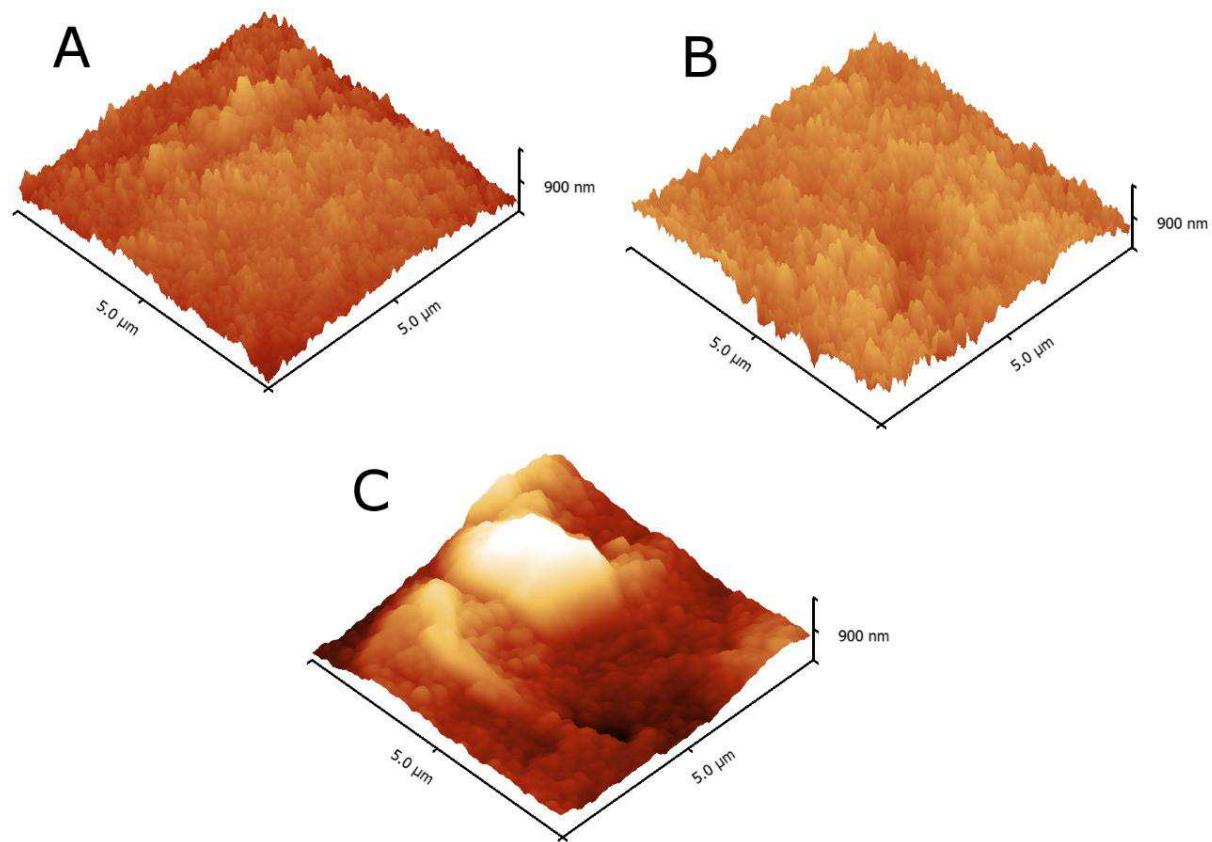


Figura 22. Microscopias de força atômica dos sistemas A) SPCE/PRF+1/BSA, B) SPCE/PRF+1/BSA/HC e C) SPCE/PRF+1/BSA/JIA. As leituras foram realizadas no modo não-contato.

Em comparação com o sistema SPCE/PRF+1, o sistema SPCE/PRF+1/BSA apresentou um substancial aumento nos valores do eixo Z. Esta observação sugere que o bloqueio foi eficiente e modificou significativamente as características da superfície. Além disso, o aumento é coerente com o maior tamanho da BSA, se comparado ao do peptídeo, bem como à formação de agregados na superfície (TENCER et al., 2007).

Os sistemas SPCE/PRF+1/BSA (**figura 22A**) e SPCE/PRF+1/BSA/HC (**figura 22B**) apresentaram aspectos morfológicos similares, com coeficientes de rugosidade (R_q) de $27,82 \pm 1,67$ nm e de $28,58 \pm 0,76$ nm, respectivamente. Tal similaridade é consistente, visto que se espera que as amostras de soro de pessoas saudáveis não contenham moléculas capazes de causar grandes alterações morfológicas na superfície do eletrodo. Por outro lado, o sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA (**figura 22C**) apresentou R_q de $83,42 \pm 5,93$ nm e um aspecto muito diferente das demais superfícies, com glóbulos irregularmente distribuídos e apresentando grandes *clusters*. A provável justificativa é a formação dos imunocomplexos entre os peptídeos imobilizados e os anticorpos presentes no soro dos pacientes com JIA. Os imunocomplexos podem formar agregados maiores, visíveis por microscopia de força atômica, conforme relatado por (FERREIRA et al., 2006).

Em conjunto, as diferentes técnicas e eletrólitos utilizados mostram a funcionalidade e versatilidade do biossensor construído, cuja capacidade de detecção e discriminação de amostras de soro foi demonstrada.

4.4. Determinação da sensibilidade do biossensor usando diferentes diluições de soro positivo

Um teste com amostras de soro de pacientes com JIA foi realizado em diferentes diluições, a fim de avaliar a resposta do sistema a variações de

concentração de alvo. Para tal, foi utilizada a voltametria de pulso diferencial em solução de ferro/ferricianeto de potássio. Os resultados são apresentados na **figura 23**.

A análise dos voltamogramas de pulso diferencial mostra que foram registradas as menores intensidades de corrente de pico (i_p) quando foram usados fatores de diluição (FD) menores, ou seja, i_p e FD diminuíram de forma proporcional.

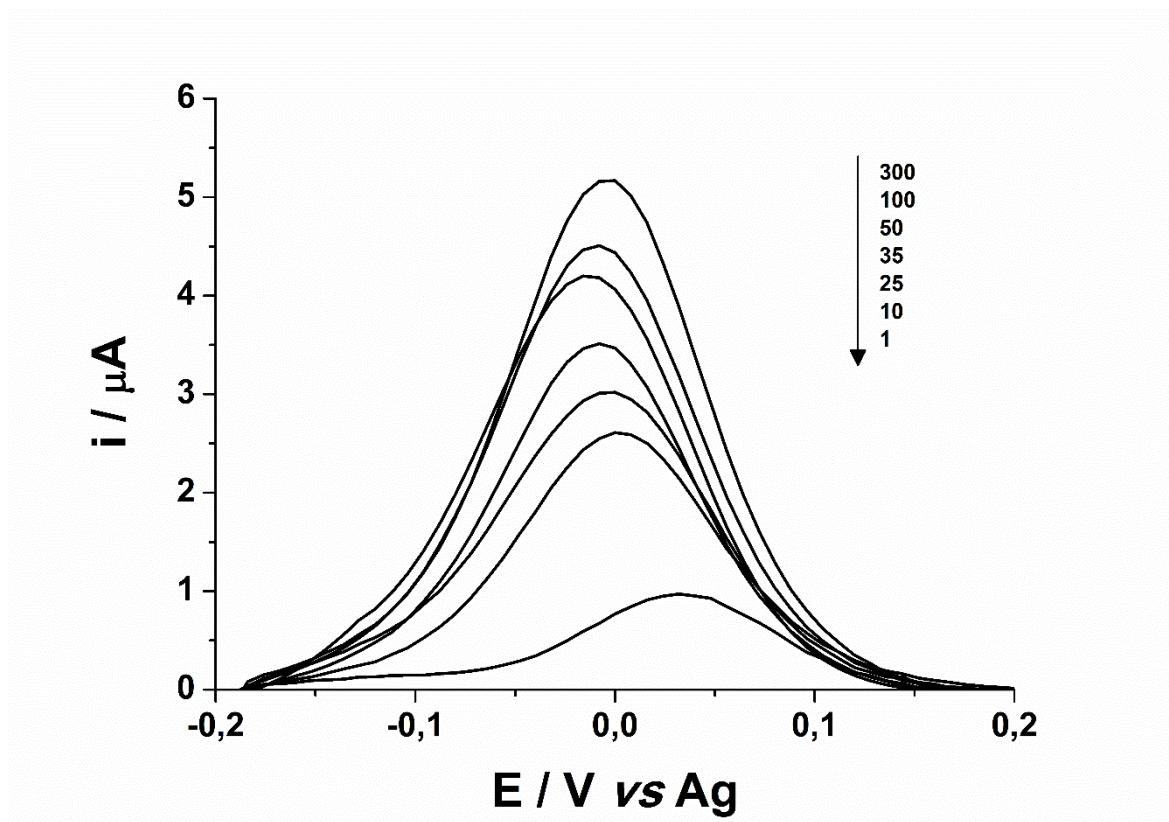


Figura 23. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes diluições de soro de um paciente com JIA. Os fatores de diluição estudados foram 300, 100, 50, 35, 25, 10 e 1 (indicados na figura pela seta). Solução: ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com KCl (1 mmol L^{-1}), velocidade: 40 mV s^{-1} .

Esta observação está relacionada aos resultados apresentados na **figura 19**. Quando o soro positivo, que contém o alvo, é aplicado ao biossensor, a interação do alvo (IgG) com o peptídeo cria uma barreira difusional que limita o acesso do íon $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à superfície do eletrodo, diminuindo a i_p relativa à oxidação. Quanto mais concentrado está o alvo (ou seja, quanto menor o fator de diluição FD), maior será esta limitação e menor será o valor de i_p . Para o caso da amostra não diluída (FD = 1), pode-se notar um deslocamento do pico para E_p mais anódico, evidenciando

que a transferência eletrônica foi dificultada pela grande concentração de alvo, em comparação às outras diluições.

A **figura 24** apresenta a relação entre a quantidade de carga (Q) calculada para esses voltamogramas e o respectivo fator de diluição (FD).

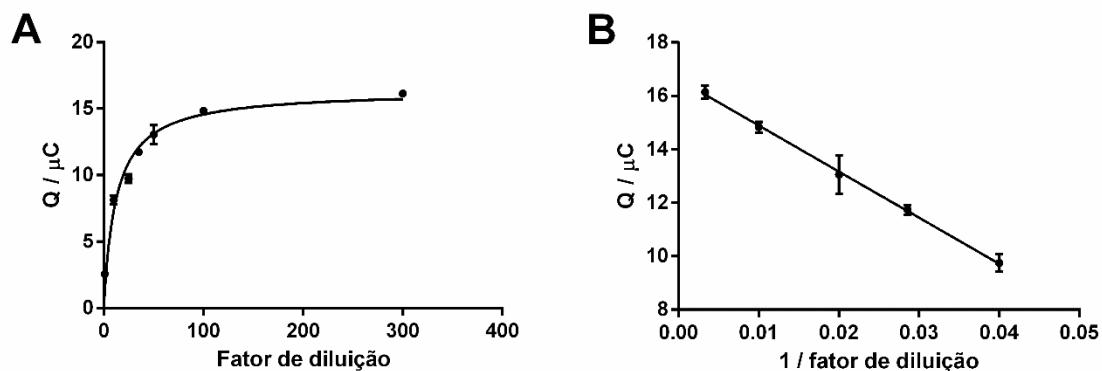


Figura 24. A) Relação entre a quantidade carga (Q) calculada a partir dos voltamogramas e o fator de diluição (FD) da amostra de soro positivo. B) Relação entre a quantidade carga (Q) calculada a partir dos voltamogramas e o inverso do fator de diluição (1/FD) da amostra de soro positivo, com equação de reta $Q = (-172,7 / FD) + 16,62$ e $r^2 = 0,9989$. Foi utilizada a amostra de um paciente com JIA e os testes foram conduzidos em triplicata.

A relação entre a quantidade de carga (Q) calculada a partir dos voltamogramas e o fator de diluição (FD) é do tipo hiperbólica, com $r^2 = 0,9615$ (**figura 24A**). Entretanto, entre as diluições 1:300 e 1:25, existe uma relação linear entre a quantidade de carga e o inverso do fator de diluição (1/FD), com equação de reta $Q = (-172,7 / FD) + 16,62$ e $r^2 = 0,9989$ (**figura 24B**).

A sensibilidade do sistema, calculada para a relação linear e em termos de fator de diluição foi de $172,8 \mu\text{C} \times \text{FD}$. Os limites de detecção e quantificação foram de 1:784 e 1:235, respectivamente. Estas figuras de mérito foram determinadas utilizando amostras de apenas um paciente com JIA. Em outros trabalhos da literatura, alvos foram detectados em amostras de soro em fatores de diluição maiores (WANG et al., 2004; DING et al., 2005; SHARMA et al., 2010; SOUTO et al., 2013; LUNA et al., 2014). Contudo, a diluição atingida pelo biossensor é suficiente para o diagnóstico de JIA, tal como é realizado no ensaio de ELISA (ARAUJO et al., 2016).

4.5. Teste com amostras de diferentes pacientes

O biosensor desenvolvido também foi estudado em relação à sua capacidade de discriminar amostras negativas e positivas de diferentes indivíduos. Foram utilizadas medidas de carga obtidas por voltametria de pulso diferencial em solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), com KCl (1 mmol L^{-1}).

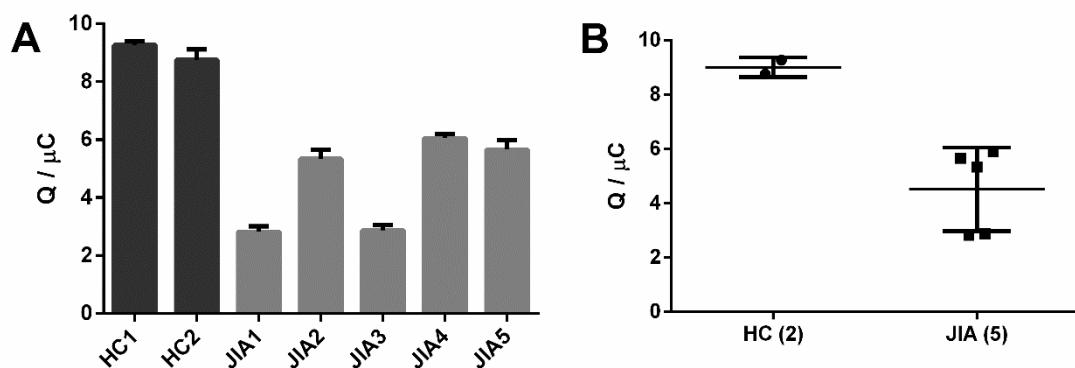


Figura 25. Comparação das cargas quantificadas por VPD para as amostras de soro de diferentes indivíduos negativos (HC) e positivos (JIA). A) Gráfico de barras da quantidade de carga para amostras de diferentes pacientes. B) Comparação das médias e desvios-padrão dos grupos de pacientes negativos e positivos.

A **figura 25** mostra que a quantidade de carga para as amostras de indivíduos saudáveis é maior do que as dos pacientes com JIA, que está em concordância com a primeira análise realizada (**figura 19**). Na **figura 25A**, pode-se observar determinada variação da resposta entre os pacientes positivos. Esta variação é esperada, já que diferentes pacientes têm condições fisiológicas, genéticas, bioquímicas e psicológicas diversas, que podem influenciar no resultado da análise. Na **figura 25B**, que reúne as médias relativas a cada grupo de pacientes, bem como os desvios-padrão destas médias, é possível observar que as amostras positivas e negativas estão bem separadas no que se refere à resposta de carga, indicando a eficiente discriminação entre amostras positivas e negativas.

Já foi demonstrado que o peptídeo PRF+1 é um excelente biomarcador para JIA, utilizando o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) como metodologia de detecção (ARAUJO et al., 2016). A discriminação dos diferentes pacientes pelas técnicas eletroquímicas apresentadas neste estudo reforça a eficiência deste

biomarcador para o diagnóstico da artrite idiopática juvenil e sua possibilidade de uso em plataformas inovadoras, como biossensores.

4.6. Teste de estabilidade

A voltametria de pulso diferencial em ferro/ferricianeto de potássio ($0,1\text{ mmol L}^{-1}$) e KCl (1 mmol L^{-1}) também foi utilizada para analisar o reconhecimento do alvo pelo biossensor em função do tempo de armazenamento. Para tal, foram utilizadas medidas de carga. A **figura 26** apresenta o gráfico obtido.

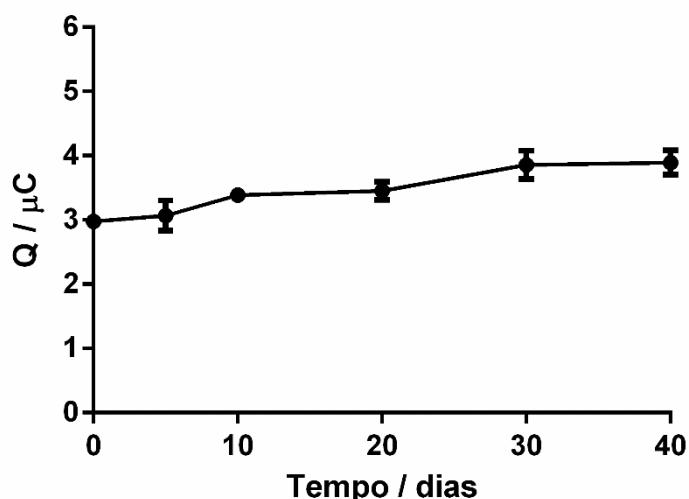


Figura 26. Quantidade de carga do sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA em função do número de dias de armazenamento do biossensor a 8°C e a seco. Para cada tempo de armazenamento, foram testadas amostras de um mesmo paciente com JIA em duplicata.

Em termos de porcentagem, a quantidade de carga dos biossensores armazenados por 40 dias foi cerca de 30% maior do que a dos biossensores utilizados no dia de seu preparo. Neste caso, o aumento da quantidade de carga no sistema SPCE/PRF+1/BSA/JIA para tempos de armazenamento maiores relaciona-se à perda da capacidade do sistema de reconhecer seu alvo. Contudo, considerando o tempo (40 dias) e as condições de armazenamento (8°C , a seco), bem como a utilização das moléculas PRF+1 e BSA, que são passíveis de desnaturação, o biossensor apresentou uma boa resposta. Ao final do

quadragésimo dia, o biosensor ainda foi capaz de reconhecer o alvo em amostras de soro, sugerindo que pode ser adequado para utilização após longos períodos de armazenamento.

5. Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico a partir da imobilização do peptídeo PRF+1 sobre a superfície ativada de eletrodos impressos de carbono, com o propósito de se desenvolver um teste diagnóstico para artrite idiopática juvenil utilizando amostras de soro sanguíneo.

Inicialmente, a ativação dos eletrodos impressos de grafite por cronoamperometria se mostrou mais adequada.

A imobilização do peptídeo PRF+1 sobre a superfície dos eletrodos impressos, após sua ativação, foi comprovada por metodologias eletroquímicas e microscopia de força atômica.

O biossensor produzido foi capaz de discriminar amostras de soro de diferentes indivíduos saudáveis e pacientes com JIA, por diferentes metodologias de detecção.

O biossensor respondeu à variação em diluição da amostra de soro aplicada, com uma faixa linear de resposta entre as diluições 1:300 e 1:25, e limites de detecção e quantificação de 1:784 e 1:235, respectivamente.

O biossensor permaneceu funcional por 40 dias, mediante armazenamento a 8°C e a seco.

Assim, foi desenvolvida uma plataforma simples, miniaturizada, funcional, estável, seletiva e sensível, que se mostrou adequada em um teste envolvendo pequeno número de amostras de pacientes com artrite idiopática juvenil, estabelecendo-se como uma promissora estratégia de diagnóstico molecular.

6. Referências

ABBASPOUR, A.; NOORI, A. Electrochemical detection of individual single nucleotide polymorphisms using monobase-modified apoferritin-encapsulated nanoparticles. **Biosensors & bioelectronics**, v. 37, n. 1, p. 11-18, 2012.

ABRAMOWICZ, S.; KIM, S.; PRAHALAD, S.; CHOUINARD, A. F.; KABAN, L. B. Juvenile arthritis: current concepts in terminology, etiopathogenesis, diagnosis, and management. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 45, n. 7, p. 801-812, 2016.

AHN, K. Y.; KWON, K.; HUH, J.; KIM, G. T.; LEE, E. B.; PARK, D.; LEE, J. A sensitive diagnostic assay of rheumatoid arthritis using three-dimensional ZnO nanorod structure. **Biosensors & bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 378-385, 2011.

ALLISON, D. P.; MORTENSEN, N. P.; SULLIVAN, C. J.; DOKTYCZ, M. J. Atomic force microscopy of biological samples. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 2, n. 6, p. 618-634, 2010.

ALMEIDA, E. S.; SILVA, L. A. J.; SOUSA, R. M. F.; RICHTER, E. M.; FOSTER, C. W.; BANKS, C. E.; MUÑOZ, R. A. A. Organic-resistant screen-printed graphitic electrodes: Application to on-site monitoring of liquid fuels. **Analytica Chimica Acta**, 2016.

ARAUJO, G. R.; FUJIMURA, P. T.; VAZ, E. R.; SILVA, T. A.; RODOVALHO, V. R.; BRITTO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; FONSECA, J. E.; SILVA, C. H.; SANTOS, P. S.; MOURAO, A. F.; CANHAO, H.; GOULART, L. R.; GONCALVES, J.; UEIRA-VIEIRA, C. A novel reactive epitope-based antigen targeted by serum autoantibodies in oligoarticular and polyarticular juvenile idiopathic arthritis and development of an electrochemical biosensor. **Immunobiology**, v. 221, n. 5, p. 634-640, 2016.

ARAUJO, G. R.; VAZ, E. R.; FUJIMURA, P. T.; FONSECA, J. E.; DE LIMA, L. M.; CANHAO, H.; VENTURINI, G.; CARDOZO, K. H.; CARVALHO, V. M.; NAPIMOGA, M. H.; GOULART, L. R.; GONCALVES, J.; UEIRA-VIEIRA, C. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display. **Arthritis research & therapy**, v. 17, p. 168, 2015.

AREVALO, F. J.; GONZALEZ-TECHERA, A.; ZON, M. A.; GONZALEZ-SAPIENZA, G.; FERNANDEZ, H. Ultra-sensitive electrochemical immunosensor using analyte peptidomimetics selected from phage display peptide libraries. **Biosensors & bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 231-237, 2012.

ARMON, K. Outcomes for Juvenile idiopathic arthritis. **Paediatrics and Child Health**, v. 24, n. 2, p. 64-71, 2014.

ARYA, S. K.; KONGSUPHOL, P.; WONG, C. C.; POLLA, L. J.; PARK, M. K. Label free biosensor for sensitive human influenza virus hemagglutinin specific

antibody detection using coiled-coil peptide modified microelectrode array based platform. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 194, p. 127-133, 2014.

BAGHERYAN, Z.; RAOOF, J. B.; GOLABI, M.; TURNER, A. P.; BENI, V. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella typhimurium* in food sample. **Biosensors & bioelectronics**, v. 80, p. 566-573, 2016.

BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of Electrochemistry**. 2^a ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005. 722 p.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2^a ed. Nova York: Wiley, 2000. 833 p.

BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical dictionary**. 1^a ed. Leipzig: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

BELKHAMSSA, N.; DA COSTA, J. P.; JUSTINO, C. I. L.; SANTOS, P. S. M.; CARDOSO, S.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T.; KSIBI, M. Development of an electrochemical biosensor for alkylphenol detection. **Talanta**, v. 158, p. 30-34, 2016.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7^a ed. Nova York: W.H. Freeman & Company, 2012.

BERKUN, Y.; PADEH, S. Environmental factors and the geoepidemiology of juvenile idiopathic arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A319-324, 2010.

BERTOK, T.; SEDIVA, A.; FILIP, J.; ILCIKOVA, M.; KASAK, P.; VELIC, D.; JANE, E.; MRAVCOVA, M.; ROVENSKY, J.; KUNZO, P.; LOBOTKA, P.; SMATKO, V.; VIKARTOVSKA, A.; TKAC, J. Carboxybetaine Modified Interface for Electrochemical Glycoprofiling of Antibodies Isolated from Human Serum. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 31, n. 25, p. 7148-7157, 2015.

BONDALAPATI, S.; JBARA, M.; BRIK, A. Expanding the chemical toolbox for the synthesis of large and uniquely modified proteins. **Nature chemistry**, v. 8, n. 5, p. 407-418, 2016.

BRUCK, N.; SCHNABEL, A.; HEDRICH, C. M. Current understanding of the pathophysiology of systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA) and target-directed therapeutic approaches. **Clinical immunology**, v. 159, n. 1, p. 72-83, 2015.

BUNYAKUL, N.; BAEUMNER, A. J. Combining electrochemical sensors with miniaturized sample preparation for rapid detection in clinical samples. **Sensors**, v. 15, n. 1, p. 547-564, 2015.

BURCU BAHADIR, E.; KEMAL SEZGINTURK, M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. **Talanta**, v. 132, p. 162-174, 2015.

CARDONA, N. I.; MONCADA, D. M.; GOMEZ-MARIN, J. E. A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN-gamma response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. **Immunobiology**, v. 220, n. 12, p. 1337-1342, 2015.

CARVALHO ADE, O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, 2011.

CASTRO, A. C. H.; FRANÇA, E. G.; PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 273-279, 2014.

CETO, X.; AM, O. M.; WANG, J.; DEL VALLE, M. Simultaneous identification and quantification of nitro-containing explosives by advanced chemometric data treatment of cyclic voltammetry at screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 107, p. 270-276, 2013.

CHAN, K. F.; LIM, H. N.; SHAMS, N.; JAYABAL, S.; PANDIKUMAR, A.; HUANG, N. M. Fabrication of graphene/gold-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 58, p. 666-674, 2016.

CLARK, L. C., JR.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962.

COELHO, E. A.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, L. E.; TAVARES, C. A.; SOTO, M.; GOULART, L. R. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 370-379, 2015.

COHEN, S. R.; BITLER, A. Use of AFM in bio-related systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 5, p. 316-325, 2008.

CONSOLARO, A.; VARNIER, G. C.; MARTINI, A.; RAVELLI, A. Advances in biomarkers for paediatric rheumatic diseases. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 11, n. 5, p. 265-275, 2015.

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

DING, Y.; WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Enzyme-catalyzed amplified immunoassay for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific IgG using Faradaic impedance spectroscopy, CV and QCM. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 382, n. 7, p. 1491-1499, 2005.

DOVER, J. E.; HWANG, G. M.; MULLEN, E. H.; PROROK, B. C.; SUH, S. J. Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. **Journal of microbiological methods**, v. 78, n. 1, p. 10-19, 2009.

DROUVALAKIS, K. A.; BANGSARUNTIP, S.; HUEBER, W.; KOZAR, L. G.; UTZ, P. J.; DAI, H. Peptide-coated nanotube-based biosensor for the detection of disease-specific autoantibodies in human serum. **Biosensors & bioelectronics**, v. 23, n. 10, p. 1413-1421, 2008.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy** Nova York: Oxford University Press, 2010. 257 p.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. **Bioelectrochemistry**, v. 81, n. 1, p. 46-52, 2011a.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds. **Electroanalysis**, v. 23, n. 6, p. 1337-1344, 2011b.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11-18, 2013.

FEARS, K. P. Measuring the pK/pl of biomolecules using X-ray photoelectron spectroscopy. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 17, p. 8526-8529, 2014.

FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; OLIVEIRA, D. R.; COSTA, P. I.; GÜELL, A. G.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5046-5052, 2006.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H.; OLIVEIRA, A. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

FRAG, E. Y.; MOHAMED, G. G.; EL-DIEN, F. A.; MOHAMED, M. E. Construction and performance characterization of screen printed and carbon paste ion selective electrodes for potentiometric determination of naphazoline hydrochloride in pharmaceutical preparations. **The Analyst**, v. 136, n. 2, p. 332-339, 2011.

GALAN, A.; COMOR, L.; HORVATIC, A.; KULES, J.; GUILLEMIN, N.; MRLJAK, V.; BHIDE, M. Library-based display technologies: where do we stand? **Molecular bioSystems**, 2016.

GAO, G.; QIAN, J.; FANG, D.; YU, Y.; ZHI, J. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium. **Analytica chimica acta**, v. 924, p. 21-28, 2016.

GHOSHAL, S.; BONDADA, V.; SAATMAN, K. E.; GUTTMANN, R. P.; GEDDES, J. W. Phage display for identification of serum biomarkers of traumatic brain injury. **Journal of neuroscience methods**, 2016.

GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FRESCHI, A. P.; CAPPARELLI, F. E.; FUJIMURA, P. T.; ALMEIDA, J. F.; FERREIRA, L. F.; GOULART, I. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Critical reviews in immunology**, v. 30, n. 2, p. 201-222, 2010.

GOWDIE, P. J.; TSE, S. M. Juvenile idiopathic arthritis. **Pediatric clinics of North America**, v. 59, n. 2, p. 301-327, 2012.

GURZĘDA, B.; FLORCZAK, P.; KEMPIŃSKI, M.; PEPLIŃSKA, B.; KRAWCZYK, P.; JURGA, S. Synthesis of graphite oxide by electrochemical oxidation in aqueous perchloric acid. **Carbon**, v. 100, p. 540-545, 2016.

HARRISON, P. L.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; MILLER, K.; STRONG, P. N. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 88, p. 115-137, 2014.

HENNESSEY, H.; AFARA, N.; OMANOVIC, S.; PADJEN, A. L. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica chimica acta**, v. 643, n. 1-2, p. 45-53, 2009.

HERSH, A. O.; PRAHALAD, S. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review. **Journal of autoimmunity**, v. 64, p. 113-124, 2015.

HUEBSCHEN, G.; ALTPETER, I.; TSCHUNCKY, R.; HERRMANN, H. G. **Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods** Woodhead publishing, 2016.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 27-38, 1996.

IZADI, Z.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; ENSAFI, A. A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. **Biosensors & bioelectronics**, v. 80, p. 582-589, 2016.

JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1172-1183, 2010.

KABESSA, Y.; EYAL, O.; BAR-ON, O.; KOROUMA, V.; YAGUR-KROLL, S.; BELKIN, S.; AGRANAT, A. J. Standoff detection of explosives and buried landmines using fluorescent bacterial sensor cells. **Biosensors & bioelectronics**, v. 79, p. 784-788, 2016.

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1-68, 2015.

KIM, C. H.; AHN, J. H.; KIM, J. Y.; CHOI, J. M.; LIM, K. C.; PARK, T. J.; HEO, N. S.; LEE, H. G.; KIM, J. W.; CHOI, Y. K. CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system. **Biosensors & bioelectronics**, v. 41, p. 322-327, 2013.

KIM, M.; LIM, J. W.; KIM, H. J.; LEE, S. K.; LEE, S. J.; KIM, T. Chemostat-like microfluidic platform for highly sensitive detection of heavy metal ions using microbial biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 65C, p. 257-264, 2014.

KOMAROVA, N. V.; ANDRIANOVA, M. S.; GUBANOVA, O. V.; KUZNETSOV, E. V.; KUZNETSOV, A. E. Development of a novel enzymatic biosensor based on an ion-selective field effect transistor for the detection of explosives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 1017-1026, 2015.

KURBANOGLU, S.; DOGAN-TOPAL, B.; RODRIGUEZ, E. P.; BOZAL-PALABIYIK, B.; OZKAN, S. A.; USLU, B. Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 775, p. 8-26, 2016.

LACOU, L.; LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 187-199, 2016.

LEAR, S.; COBB, S. L. Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 30, n. 3, p. 271-277, 2016.

LECAILLE, F.; LALMANACH, G.; ANDRAULT, P. M. Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases. **Biochimie**, v. 122, p. 151-168, 2016.

LERNER, A.; JEREMIAS, P.; MATTHIAS, T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. **International Journal of Celiac Disease**, v. 3, n. 4, p. 151-155, 2016.

LI, H.; CAO, Y.; WU, X.; YE, Z.; LI, G. Peptide-based electrochemical biosensor for amyloid beta 1-42 soluble oligomer assay. **Talanta**, v. 93, p. 358-363, 2012.

LI, M.; LI, Y. T.; LI, D. W.; LONG, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays--a review. **Analytica chimica acta**, v. 734, p. 31-44, 2012.

LI, R.; HUANG, H.; HUANG, L.; LIN, Z.; GUO, L.; QIU, B.; CHEN, G. Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 233-237, 2013.

LI, Y.; AFRASIABI, R.; FATHI, F.; WANG, N.; XIANG, C.; LOVE, R.; SHE, Z.; KRAATZ, H. B. Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 58, p. 193-199, 2014.

LIU, M.; ZHANG, C.; LIU, F. Understanding wax screen-printing: a novel patterning process for microfluidic cloth-based analytical devices. **Analytica chimica acta**, v. 891, p. 234-246, 2015.

LIU, Q.; WANG, J.; BOYD, B. J. Peptide-based biosensors. **Talanta**, v. 136, p. 114-127, 2015.

LIU, R.; LI, X.; XIAO, W.; LAM, K. S. Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries. **Advanced drug delivery reviews**, 2016.

LIU, X.; MARRAKCHI, M.; XU, D.; DONG, H.; ANDREESCU, S. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. **Biosensors & bioelectronics**, v. 80, p. 9-16, 2016.

LUNA, D. M.; OLIVEIRA, M. D.; NOGUEIRA, M. L.; ANDRADE, C. A. Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. **Chemistry and physics of lipids**, v. 180, p. 7-14, 2014.

MALECKA, K.; STACHYRA, A.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A.; ZAGÓRSKI-OSTOJA, W.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 290-297, 2016.

MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; KARWACIAK, I.; RATAJEWSKI, M.; GAGALA, I.; JURCZAK, T.; ZALEWSKI, M.; PULASKI, L. Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts. **Aquatic toxicology**, v. 168, p. 1-10, 2015.

MAVER, U.; VELNAR, T.; GABERŠČEK, M.; PLANINŠEK, O.; FINŠGAR, M. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 96-111, 2016.

MCMAHON, A.-M.; TATTERSALL, R. Diagnosing juvenile idiopathic arthritis. **Paediatrics and Child Health**, v. 21, n. 12, p. 552-557, 2011.

MINDEN, K.; NIEWERTH, M.; LISTING, J.; BIEDERMANN, T.; SCHONTUBE, M.; ZINK, A. Burden and cost of illness in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 7, p. 836-842, 2004.

MOHAMED, H. M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1-11, 2016.

MONOSIK, R.; STRED'ANSKY, M.; STURDIK, E. Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2012.

MOORE, T. L. Immune Complexes in Juvenile Idiopathic Arthritis. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 177, 2016.

MORONI, L.; BIANCHI, I.; LLEO, A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 6-7, p. A386-392, 2012.

MURUGAIYAN, S. B.; RAMASAMY, R.; GOPAL, N.; KUZHANDAIVELU, V. Biosensors in clinical chemistry: An overview. **Advanced biomedical research**, v. 3, p. 67, 2014.

NASCIMENTO, V. B. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 1998.

OBERLE, E. J.; HARRIS, J. G.; VERBSKY, J. W. Polyarticular juvenile idiopathic arthritis - epidemiology and management approaches. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 379-393, 2014.

PANG, X.; PAN, J.; GAO, P.; WANG, Y.; WANG, L.; DU, B.; WEI, Q. A visible light induced photoelectrochemical aptsensor constructed by aligned ZnO@CdTe core shell nanocable arrays/carboxylated g-C3N4 for the detection of Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 gene. **Biosensors & bioelectronics**, v. 74, p. 49-58, 2015.

PAVAN, S.; BERTI, F. Short peptides as biosensor transducers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3055-3070, 2012.

PEREZ-RAFOLS, C.; SERRANO, N.; DIAZ-CRUZ, J. M.; ARINO, C.; ESTEBAN, M. Glutathione modified screen-printed carbon nanofiber electrode for the voltammetric determination of metal ions in natural samples. **Talanta**, v. 155, p. 8-13, 2016.

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

PETTY, R. E.; SOUTHWOOD, T. R.; MANNERS, P.; BAUM, J.; GLASS, D. N.; GOLDENBERG, J.; HE, X.; MALDONADO-COCO, J.; OROZCO-ALCALA, J.; PRIEUR, A. M.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E.; WOO, P.; INTERNATIONAL LEAGUE OF ASSOCIATIONS FOR, R. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 2, p. 390-392, 2004.

PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R. D.; KALE, L.; SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

PIERMARINI, S.; VOLPE, G.; ESTI, M.; SIMONETTI, M.; PALLESCHI, G. Real time monitoring of alcoholic fermentation with low-cost amperometric biosensors. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 749-754, 2011.

RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. **Peptides**, v. 32, n. 2, p. 415-420, 2011.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LANGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403-2412, 2010.

RATHEE, K.; DHULL, V.; DHULL, R.; SINGH, S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 35-54, 2016.

RENGER, F.; BANG, H.; FEIST, E.; FREDENHAGEN, G.; NATUSCH, A.; BACKHAUS, M.; BURMESTER, G. R.; EGERER, K. Immediate determination of ACPA and rheumatoid factor--a novel point of care test for detection of anti-MCV antibodies and rheumatoid factor using a lateral-flow immunoassay. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 3, p. R120, 2010.

RESTREPO, R.; LEE, E. Y. Epidemiology, pathogenesis, and imaging of arthritis in children. **The Orthopedic clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 213-225, vi, 2012.

REVENGA-PARRA, M.; GARCIA-MENDIOLA, T.; GONZALEZ-COSTAS, J.; GONZALEZ-ROMERO, E.; MARIN, A. G.; PAU, J. L.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Simple diazonium chemistry to develop specific gene sensing platforms. **Analytica Chimica Acta**, v. 813, p. 41-47, 2014.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, L. F.; MONTE, A. F. G. D.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6528-6538, 2014.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

ROTARIU, L.; LAGARDE, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; BALA, C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 80-87, 2016.

SAHIN, M.; AYRANCI, E. Electrooxidation of NADH on Modified Screen-Printed Electrodes: Effects of Conducting Polymer and Nanomaterials. **Electrochimica Acta**, v. 166, p. 261-270, 2015.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications**. 2^a ed. Springer, 2010. 366 p.

SENTHILKUMAR, K.; SITHINI, T. N.; THIYAGARAJAN, N.; BASKAR, S.; ZEN, J.-M. Facile and stable immobilization of adenine on screen printed carbon

electrode assisted by electrogenerated chlorine for electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 60, p. 113-116, 2015.

SHARMA, M. K.; AGARWAL, G. S.; RAO, V. K.; UPADHYAY, S.; MERWYN, S.; GOPALAN, N.; RAI, G. P.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PRAKASH, S. Amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/alumina sol-gel modified screen-printed electrodes for antibodies to *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2. **The Analyst**, v. 135, n. 3, p. 608-614, 2010.

SHARMA, S.; ZAPATERO-RODRIGUEZ, J.; ESTRELA, P.; O'KENNEDY, R. Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 577-601, 2015.

SHINOHARA, H.; KURAMITZ, H.; SUGAWARA, K. Design of an electroactive peptide probe for sensing of a protein. **Analytica chimica acta**, v. 890, p. 143-149, 2015.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SONGA, E. A.; OKONKWO, J. O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. **Talanta**, v. 155, p. 289-304, 2016.

SOUTO, D. E.; SILVA, J. V.; MARTINS, H. R.; REIS, A. B.; LUZ, R. C.; KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors & bioelectronics**, v. 46, p. 22-29, 2013.

SUIKKOLA, J.; BJORNINEN, T.; MOSALLAEI, M.; KANKKUNEN, T.; ISO-KETOLA, P.; UKKONEN, L.; VANHALA, J.; MANTYSALO, M. Screen-Printing Fabrication and Characterization of Stretchable Electronics. **Scientific reports**, v. 6, p. 25784, 2016.

TENCER, M.; CHARBONNEAU, R.; LAHOUD, N.; BERINI, P. AFM study of BSA adlayers on Au stripes. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 23, p. 9209-9214, 2007.

THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; RICHARD, A. D.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification. **Sensors and Actuators B**, v. 30, 1996.

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

VAN DEN KIEBOOM, C. H.; VAN DER BEEK, S. L.; MÉSZÁROS, T.; GYURCSÁNYI, R. E.; FERWERDA, G.; DE JONGE, M. I. Aptasensors for viral diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 58-67, 2015.

VASILESCU, A.; MARTY, J.-L. Electrochemical aptasensors for the assessment of food quality and safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 60-70, 2016.

VIGNESVAR, S.; SUDHAKUMARI, C. C.; SENTHILKUMARAN, B.; PRAKASH, H. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications - An Overview. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 4, p. 11, 2016.

VILLA, M. G.; JIMENEZ-JORQUERA, C.; HARO, I.; GOMARA, M. J.; SANMARTI, R.; FERNANDEZ-SANCHEZ, C.; MENDOZA, E. Carbon nanotube composite peptide-based biosensors as putative diagnostic tools for rheumatoid arthritis. **Biosensors & bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 113-118, 2011.

WAGNER, W.; SACHRAJDA, I.; PULASKI, L.; HALATEK, T.; DASTYCH, J. Application of cellular biosensors for analysis of bioactivity associated with airborne particulate matter. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 5, p. 1132-1142, 2011.

WANG, H.; LEI, C.; LI, J.; WU, Z.; SHEN, G.; YU, R. A piezoelectric immunoagglutination assay for Toxoplasma gondii antibodies using gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 7, p. 701-709, 2004.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 2006.

WANG, S.; ZENG, X.; YANG, Q.; QIAO, S. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

WIPFF, J.; SPARSA, L.; LOHSE, A.; QUARTIER, P.; KAHAN, A.; DESLANDRE, C. J. Impact of juvenile idiopathic arthritis on quality of life during transition period at the era of biotherapies. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**, v. 83, n. 1, p. 69-74, 2016.

YANG, J.; KIM, S. E.; CHO, M.; YOO, I. K.; CHOE, W. S.; LEE, Y. Highly sensitive and selective determination of bisphenol-A using peptide-modified gold electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 61, p. 38-44, 2014.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 7-8, 2015.

YANG, X.; WU, F.; CHEN, D.-Z.; LIN, H.-W. An electrochemical immunosensor for rapid determination of clenbuterol by using magnetic nanocomposites to modify screen printed carbon electrode based on competitive immunoassay mode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 529-535, 2014.

ZHANG, Z.; XU, L.; WANG, Z. Screening serum biomarkers for early primary hepatocellular carcinoma using a phage display technique. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 25, n. 6, p. 402-408, 2011.