

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**IMUNOSENSOR REUTILIZÁVEL PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNA C-
REATIVA EM SORO HUMANO**

SANDRO HENRIQUE DIAS RIBEIRO

**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
2019**

SANDRO HENRIQUE DIAS RIBEIRO

**IMUNOSSENSOR REUTILIZÁVEL PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNA C-
REATIVA EM SORO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**UBERLÂNDIA-MG
2019**

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

R484i Ribeiro, Sandro Henrique Dias, 1994
2019 Imunossensor reutilizável para a detecção de proteína C-reativa em
 soro humano [recurso eletrônico] / Sandro Henrique Dias Ribeiro. -
 2019.

Orientadora: Ana Graci Brito-Madurro.
Coorientador: João Marcos Madurro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1321>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Inflamação. 3. Proteína C. 4. Técnicas
biossensoriais. I. Brito-Madurro, Ana Graci, 1967, (Orient.). II. Madurro,
João Marcos, 1961, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**IMUNOSSENSOR REUTILIZÁVEL PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNA C-
REATIVA EM SORO HUMANO**

ALUNO: Sandro Henrique Dias Ribeiro

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro

Examinadores: Prof^ª. Dr^ª. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges

Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista

Prof^ª. Dr^ª. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Data da Defesa: 27/02/2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, modalidade Mestrado Acadêmico para o formato da Dissertação foram contempladas

Ana Graci Brito Madurro

*Aos meus pais
Ronaldo e Elza,
que junto a Deus,
são simplesmente
meu tudo.*

AGRADECIMENTOS

- ❑ À Deus por estar presente em todos os momentos.
- ❑ Aos meus pais Ronaldo e Elza, meus irmãos Samuel e Bruno, minhas cunhadas Silza e Leidyenne por todo amor, carinho e compreensão.
- ❑ À todos os meus familiares pelos contatos e vivências.
- ❑ À toda equipe do LAFIP/LABIOSENS que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Ana Cristina, Anna Clara, Bárbara, Carlos, Fernanda, Heliane, Jéssica, João Afonso, José Manuel, Jussara, Lívia, Mônica, Pedro, Priscila, Rafael, Rafaela e a todos os outros que passaram e deixaram a sua mensagem.
- ❑ Aos meus queridos amigos(as): Danielle, Diego, Felipe, Fernando, Jessica, Laíse, Lorena, Murilo, Mônica, Michelly, Phelipe, Sam Lenner, Suzenkelly, Tainá, Vítor e vários outros que mesmo seguindo caminhos diferentes fizeram parte dessa etapa.
- ❑ À professora Ana Graci e professor João Marcos pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação e confiança.
- ❑ Aos membros da banca que aceitaram participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.
- ❑ À todos professores(as) e técnicos(as) do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pelo suporte dado a esse trabalho, em especial à Gisele e Viviane, pelo auxílio em todas as questões formais.
- ❑ À UFU, Capes, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.
- ❑ À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

*"As melhores e mais belas coisas do mundo não
podem ser vistas ou tocadas. Elas devem ser
sentidas com o coração."*

— Helen Keller

RESUMO

A proteína C reativa (CRP) é um importante marcador de processo inflamatório e/ou lesão tecidual e está associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em especial na formação da placa aterosclerótica. Seus níveis séricos são úteis no monitoramento da atividade inflamatória, no tratamento e na evolução clínica, bem como nas detecções de complicações infecciosas pós-operatórias. Sendo assim, a quantificação de CRP é de extrema importância clínica para o auxílio no diagnóstico e minimização de agravamento de doenças. Os biossensores são alternativas em potencial frente às metodologias convencionais existentes de diagnóstico, principalmente pelo baixo custo, rapidez, precisão, especificidade e portabilidade. Assim, este trabalho descreve a preparação de um imunossensor eletroquímico reutilizável baseado em eletrodo de carbono modificado com óxido de grafeno reduzido e politiramina para a detecção da proteína C reativa no soro humano. Este imunossensor foi capaz de distinguir diferentes concentrações de CRP em soro e soro enriquecidos de pacientes humanos por voltametria de pulso diferencial, com limite de detecção de $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Análises por microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de impedância eletroquímica corroboraram com a análise voltamétrica. O imunossensor apresentou seletividade, capacidade de regeneração e estabilidade, cerca de 90% por 50 dias de armazenamento, permitindo ainda a comparação dos níveis de CRP obtidos com os dados laboratoriais sendo, portanto, uma plataforma promissora para quantificação de CRP em *point-of-care*.

Palavras-chave: biossensor, eletrodo de grafite, inflamação, nanocompósito, óxido de grafeno reduzido, politiramina.

ABSTRACT

C-reactive protein (CRP) is an important marker of inflammatory process and / or tissue injury and is associated with the development of cardiovascular diseases, especially in the formation of atherosclerotic plaque. Its serum levels are useful in monitoring inflammatory activity, in treatment and clinical evolution, and in detecting post-operative infectious complications. Thus, the quantification of CRP is of extreme clinical importance to aid in the diagnosis and minimization of disease worsening. Biosensors are potential alternatives to existing conventional diagnostic methodologies, especially for low cost, speed, accuracy, specificity and portability. This work describes the preparation of a reusable electrochemical immunosensor based in modified carbon electrode with reduced graphene oxide and polytyramine for the detection of C-reactive protein (CRP) in serum. This immunosensor was able to distinguish different concentrations of CRP in enriched serum and serum from human patients by differential pulse voltammetry, with a detection limit of $0.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ and quantification limit of $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Analyses by atomic force microscopy, scanning electron microscopy and electrochemical impedance spectroscopy corroborated with voltammetric analysis. The immunosensor showed selectivity, regeneration capacity and stability, about 90% for 50 days of storage, also allowing the comparison of the CRP levels obtained with the laboratory data and, therefore, a promising platform for quantification of CRP in point-of-care.

Keywords: biosensor, graphite electrode, inflammation, nanocomposite, polytyramine, reduced graphene oxide

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Estrutura molecular e morfológica da CRP humana. (a) Micrografia eletrônica da CRP mostrando o disco pentamérico (setas). (b) Diagrama da estrutura cristalina, mostrando a alça de lectina e os dois átomos de cálcio (esferas) no sítio de ligação de cada protômero. (c) Modelo com preenchimento espacial da molécula de CRP mostrando uma única molécula de fosfocolina localizada no sítio de ligação de cada protômero.3
- Figura 2** – Principais vias que levam ao aumento da produção de CRP frente a infecção e a lesão tecidual6
- Figura 3** – Padrão de resposta de biomarcadores inflamatórios frente à lesão tecidual.....7
- Figura 4** – Representação de uma artéria coronariana em que houve o desenvolvimento de placa aterosclerótica, modificando o fluxo sanguíneo normal9
- Figura 5** – Migração de monócitos na aterogênese 10
- Figura 6** – (A) Ultrassonografia da artéria coronária demonstrando a progressão da lesão aterosclerótica, resultando em diminuição do lúmen arterial. (B) Corte histológico da artéria interventricular anterior evidenciando grande placa aterosclerótica, com área de ruptura (setas) e trombose luminal oclusiva (asterisco). Hematoxilina-eosina, 2,5×. 11
- Figura 7** – Esquema da estratificação de risco cardíaco de acordo com a concentração de CRP detectada no sangue 12
- Figura 8** – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor..... 15
- Figura 9** – Eletrodo de grafite funcionalizado com filme polimérico e imobilização da sonda (anticorpo), com bloqueio, que reconhecerá seu antígeno presente na amostra 17
- Figura 11** – Estrutura química do monômero polititamina22
- Figura 12** – Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada23

Figura 13 – Componentes de um sistema voltamétrico (a) potenciostato/galvanostato, (b) computador, (c) célula eletroquímica, (d) eletrodo de trabalho, (e) eletrodo auxiliar, (f) eletrodo de referência	25
Figura 14 – Forma de onda característica da VC, com potencial elétrico em função do tempo. Cada ciclo é composto por dois segmentos: um que varia o potencial de A a B e outro que vai de B a A	26
Figura 15 – Exemplo de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo 0,3V e um de redução próximo a 0,2V	26
Figura 16 – Forma de onda característica da voltametria de pulso diferencial. As leituras de correntes são feitas antes e depois de cada pulso e a diferença entre elas é registrada em função do potencial.....	28
Figura 17 – Exemplo de voltamograma de pulso diferencial	28
Figura 18 – Espectroscopia de impedância eletroquímica (A) Representação do diagrama de Nyquist. (B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. RS: resistência da solução; RCT: resistência à transferência de carga; W: impedância de Warburg; CDL: capacitância	29
Figura 19 – Esquema do funcionamento do microscópio de força atômica	30
Figura 20 – Esquema do funcionamento do microscópio eletrônico de varredura	31

CAPÍTULO 2

Figure 1 – Schematic representation of the immunosensor.	48
Figure 2 – Histogram obtained from current peak response of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation (A), SEM (B) and AFM (C) images of the electrodes. (a) GE (b) GE/ERGO/PTyr (c) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP (d) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol L^{-1}) in 0.1 mol.L^{-1} KCl. Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s^{-1}	50
Figure 3 – SEM (A) and AFM (B) images of the electrodes, histogram obtained from the	

resistance to charge transfer by EIS (C). (a) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA/negative sample and (b) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA/positive sample. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol.L⁻¹).....51

Figure 4 – Differential pulse voltammograms (A) and calibration curve (B) obtained from current peak response of [Fe(CN)₆]⁴⁻/oxidation in GE/ERGO/PTyr /Anti-CRP/BSA incubated with different concentrations of CRP (1.09, 10, 25, 50, 75 and 100 µg mL⁻¹) in human serum. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol.L⁻¹). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s⁻¹52

Figure 5 – Storage stability profile of immunosensor at 10°C during 50 days (A) and regeneration stage (B). Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol.L⁻¹). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s⁻¹53

Figure 6 – Histogram obtained from current peak response of [Fe(CN)₆]⁴⁻ oxidation in GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA incubated with samples from different patients with altered CRP values (1–5) and healthy controls (HC1–HC5). Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol.L⁻¹). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s⁻¹.....55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Analytical parameters of different electrochemical immunosensors recently described for CRP detection in serum sample53

Table 2. Mean results of the measurements of serum samples from patients with altered CRP using both the proposed immunosensor and the immunoturbidimetric assay. Errors represents the standard deviation55

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFM** – Microscopia de força atômica
- Anti-CRP** – Anticorpo específico para Proteína C reativa
- APPs** – Proteínas de fase aguda
- BIOSENS** – Laboratório de Biosensores
- BSA** – Albumina de soro bovino
- Cdl** – Íons carregados na solução
- CRP** – Proteína C-reativa
- DAMPs** – Padrões moleculares associados ao dano tecidual
- DCVs** – Doenças cardiovasculares
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- EG** – Eletrodo de grafite
- ELISA** – Imunoabsorção enzimática
- EQM** – Eletrodo quimicamente modificado
- ERGO** – Óxido de grafeno reduzido
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- GE** – Eletrodo de grafite
- GO** – Óxido de grafeno
- IL1** – Interleucina-1
- IL1- β** – Interleucina-1 β
- IL-6** – Interleucina-6
- IL-8** – Interleucina-6
- IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LAFIP** – Laboratório de Filmes Poliméricos
- LDL-c** – Lipoproteínas de baixa densidade
- mA** – Miliampère
- MCP-1** – Proteína quimiotática de monócitos 1
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura
- MMPs** – Matrix metaloproteases
- NF- κ B** – Factor nuclear kappa B
- OG** – Óxido de Grafeno

OGre – Óxido de grafeno reduzido
oxLDL – Lipoproteínas de baixa densidade oxidada
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PAS – Proteína amilóide sérica
PLM – Proteína ligante de manose
PTyr – Politiramina
Rct – Resistência ao transporte de carga
RNAM – Ácido ribonucléico mensageiro
RS – Resistência da solução
SEM – Microscopia eletrônica de varredura
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TLR – Receptores *toll-like*
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
VC – Voltametria cíclica
VCAM-1 – Proteína de adesão celular vascular 1
VPD – Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
1 Proteína C Reativa	3
1.1 O Processo Inflamatório	4
1.2 Doença Aterosclerótica.....	8
1.3 Quantificação laboratorial de CRP	13
2 Biossensores	14
2.1 Imunossensores.....	16
2.2 Eletrodos quimicamente modificados.....	18
2.3 Grafeno e derivados	19
2.4 Polímeros	20
2.5 Nanocompósitos	22
2.6 Estratégias para a imobilização da biomolécula	22
3 Técnicas analíticas	24
3.1 Técnicas eletroquímicas.....	24
3.1.1 Sistema eletroquímico.....	24
3.1.2 Voltametria cíclica	25
3.1.3 Voltametria de pulso diferencial	27
3.1.4 Espectroscopia de Impedância	29
3.2 Técnicas de análise morfológica.....	30
3.2.1 Microscopia de força atômica.....	30
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
4 Objetivos	32
5 Referências.....	33
CAPÍTULO 2 PROPOSAL OF A REUSABLE IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF C-REACTIVE PROTEIN IN HUMAN SERUM	
Abstract.....	44
Resumo.....	44
1 Introduction	45

2 Experimental	46
2.1 Materials and Instrumentation	46
2.2 Modification of graphite electrode with ERGO/polytyramine	47
2.3 Immobilization of anti-CRP and detection of antigen in serum	47
2.4 Morphological analysis.....	49
2.5 Statistical analysis.....	49
3 Results and discussion.....	49
4 Conclusion.....	56
Acknowledgments	56
References	56

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório representa um mecanismo importante de defesa do organismo contra: agentes infecciosos, lesões teciduais e/ou condições de doenças crônicas. A proteína C reativa (CRP) é um dos produtos do processo inflamatório cuja produção ocorre no fígado e tem papel de extrema importância clínica no diagnóstico e monitoramento da inflamação, bem como possibilita acompanhar um tratamento, por exemplo, com antibióticos e anti-inflamatórios. Além disso, pode ainda indicar complicações pós-cirúrgicas e sua produção exacerbada e contínua, pode estimular o desenvolvimento de complicações patológicas, como a doença aterosclerótica.

A análise dos níveis séricos da proteína C reativa é de relevância para o tratamento da inflamação e também na prevenção de possíveis complicações. O desenvolvimento de biossensores para auxiliar na detecção de marcadores, como a CRP, e/ou diagnóstico de doenças é uma ferramenta significativa devido às vantagens que estes dispositivos apresentam, tais como: baixo custo, sensibilidade, seletividade e possibilidade de miniaturização.

Sendo assim, este trabalho visou à construção de um imunossensor para a detecção e quantificação de proteína C reativa, por meio da imobilização de um anticorpo (anti-CRP) sobre eletrodos de grafite modificados com óxido de grafeno reduzido e polipirrolina.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. A dissertação foi dividida em: **Capítulo 1** - Fundamentação Teórica e **Capítulo 2** - Proposal of a reusable immunosensor for detection of C-reactive protein in human serum.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Proteína C reativa

A Proteína C reativa (CRP, do inglês *C-reactive protein*), foi descoberta em 1930, por William S. Tillet e Thomas Francis Jr., nos Estados Unidos em pacientes com pneumonia pneumocócica e assim nomeada pela sua capacidade de precipitar o polissacarídeo C somático de *Streptococcus pneumoniae* (TILLET; FRANCIS, 1930).

A CRP é uma proteína de plasma pertencente à família das pentraxinas e apresenta arranjo pentamérico cíclico (**Figura 1a e 1b**), com cinco protômeros idênticos e não-glicosilados (**Figura 1c**), de aproximadamente 23 kDa cada, associados por cinco ligações não covalentes. A proteína em questão tem uma sequência de 224 resíduos de aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 18 resíduos, responsável por sinalizar sua secreção. Possui ainda sítios de ligação dependentes de cálcio e partículas de colesterol de baixa densidade (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

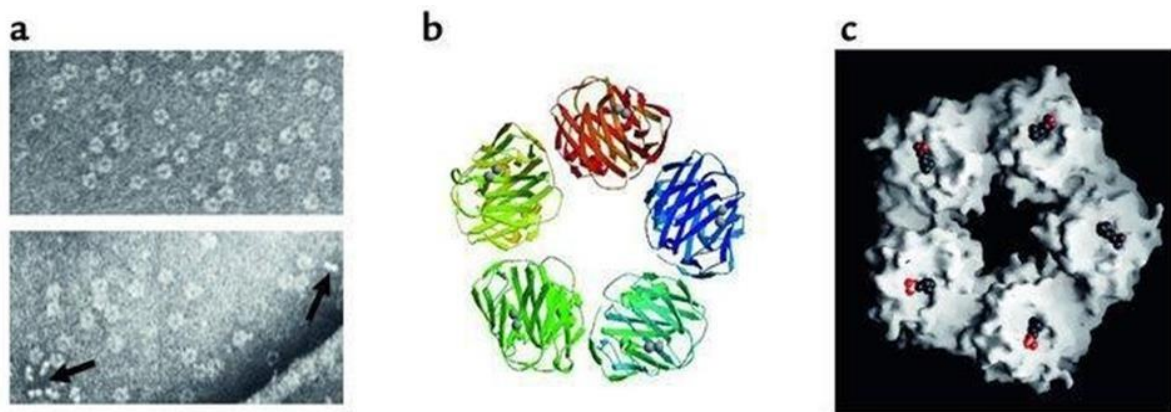


Figura 1 – Estrutura molecular e morfológica da CRP humana. (a) Micrografia eletrônica da CRP mostrando o disco pentamérico (setas). (b) Diagrama da estrutura cristalina, mostrando a alça de lectina e os dois átomos de cálcio (esferas) no sítio de ligação de cada protômero. (c) Modelo com preenchimento espacial da molécula de CRP mostrando uma única molécula de fosfocolina localizada no sítio de ligação de cada protômero (Fonte: PEPYS, HIRSCHFIELD, 2003).

A CRP é expressa por hepatócitos em resposta a infecção ou inflamação sistêmica e sua produção é estimulada principalmente por interleucinas, em especial IL-1 e IL-6 (DU CLOS; MOLD, 2004). Em adição, alguns estudos têm demonstrado evidências de produção da CRP não somente nos hepatócitos, mas também em macrófagos, tecido adiposo, endotelial ou células da musculatura lisa (BAIDOSHVILI et al., 2002; OUCHI, 2003; VENUGOPAL; DEVARAJ; JIALAL, 2005; YASOJIMA et al., 2001).

A CRP é considerada um bioindicador precoce de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, de lesão tecidual e de fundamental importância em outras condições, como

um biomarcador de inúmeras doenças e desordens da homeostasia. Além disso, pode exercer papel de importância no desencadeamento de doenças, como exemplo, a placa de ateroma no processo aterosclerótico (GILSTRAP; WANG, 2012; MONTGOMERY; BROWN, 2013). As análises dos níveis de CRP nas amostras biológicas, também são de importância crítica para o diagnóstico e monitoramento do progresso quimioterápico/intervenção antibiótica e anti-inflamatória, e no acompanhamento pós-cirúrgico ou outro tipo de intervenção de saúde personalizada (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Diante disso, compreende-se que os métodos analíticos devem ser altamente sensíveis, seletivos, rápidos e confiáveis, usando o volume mínimo de amostra.

A seguir, o trabalho em questão abordará a fisiopatologia da inflamação e o desenvolvimento da placa de ateroma e a participação da proteína C reativa nesses processos. Na sequência, serão destacados métodos de quantificação laboratorial da CRP.

1.1 Processo Inflamatório

O processo inflamatório é compreendido como uma resposta do organismo frente a algum tipo de agressão local ou sistêmica, capaz de desencadear a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Dentre os desencadeadores de SIRS, temos agressões tanto de um organismo patogénico (vírus, bactérias, fungos, protozoários, nematelmintos, entre outros), como por outras causas que originam a resposta aguda não infecciosa (trauma, queimaduras, intervenções cirúrgicas e reações inflamatórias não infecciosas) (CAVAILLON, 1996; GERMOLEC, 2018; SHIELS et al., 2013).

O processo de controle dos danos ou agressões com origem interna ou externa, no organismo, se inicia com a liberação de mediadores inflamatórios, como determinadas citocinas, no local da agressão, que posteriormente acionarão um processo conhecido como resposta de fase aguda. Este processo pode conseguir controlar a agressão e resolver-se ou evoluir de duas formas distintas: instaurando-se uma SIRS ou gerando-se uma inflamação crónica, na qual se mantêm determinados níveis de ativação dos componentes do sistema de resposta aguda (CAVAILLON, 1996; GERMOLEC, 2018; SHIELS et al., 2013).

No desenvolvimento da resposta de fase aguda além da produção e liberação de citocinas, tem-se a ação imunológica ativa, bem como outros mediadores liberados que iniciam alterações sistêmicas, culminando em alterações na concentração de algumas proteínas plasmáticas, também chamadas proteínas de fase aguda (APPs). Dentre as proteínas que se alteram no curso da inflamação, algumas tendem a diminuir sua

concentração (APPs negativas), tais como a albumina, a globulina e a transferrina. Outras proteínas de fase aguda (APPs positiva), como a proteína C-reativa (CRP); proteína amilóide sérica (PAS); haptoglobina; α -1 glicoproteína-ácida; ceruloplasmina; fibrinogênio; proteína ligante de manose (PLM) e α -1-antitripsina aumentam suas concentrações no sangue. As proteínas de fase aguda positivas principais são a CRP, a PAS e a haptoglobina as quais são sintetizadas e liberadas principalmente pelos hepatócitos, logo após a estimulação pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas para a corrente sanguínea (GABAY, KUSHNER, 1999).

A CRP foi a primeira proteína de fase aguda a ser descrita, sendo considerada um marcador sistêmico extremamente sensível desse processo de inflamação e dos danos teciduais (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Dessa forma, é importante compreender o mecanismo de produção e o comportamento da CRP nesses processos fisiopatológicos.

Na **figura 2**, é possível verificar as principais vias que levam ao aumento da produção de CRP. No caso de uma infecção, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) estimulam a ativação do complexo proteico NF κ B e outras vias inflamatórias por receptores *toll-like* expressos na superfície (TLR) desencadeando assim, a liberação de citocinas inflamatórias de macrófagos, como a IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral TNF α . A via do PAMP é mais ativa na regulação positiva da liberação de CRP do fígado. Outra via paralela de ativação da produção de CRP, ocorre no caso de lesão tecidual, onde tem-se a liberação de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs) que ativam o processamento de inflamassomas de IL-1 β e IL-18 após ligação à receptores endossomais. Com isso, tem-se a produção da CRP pentamérica que se liga aos tecidos alvo através de receptores Fc e outras moléculas de ligação, tais como M-ficolina. A CRP, produzida em ambas as vias, pode ser modificada para CRP monomérica e até mesmo peptídeos menores derivados da clivagem proteolítica em um ambiente pró-inflamatório (VASHIST, 2016; CAVAILLON, 2018).

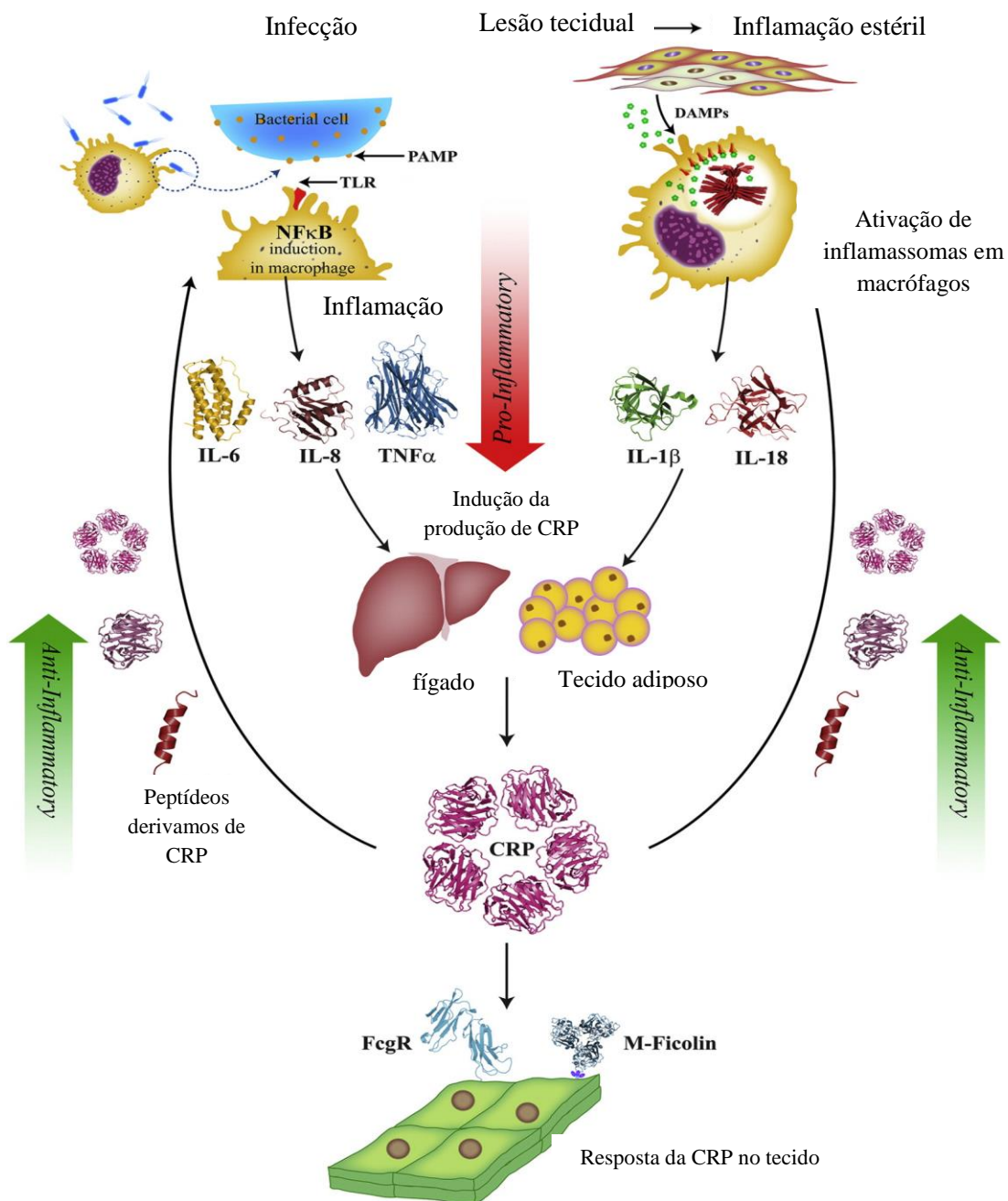


Figura 2 – Principais vias que levam ao aumento da produção de CRP frente a infecção e a lesão tecidual (Adaptado de VASHIST, 2016).

A produção da proteína C reativa possui a capacidade de influenciar uma ou várias etapas do processo inflamatório (GABAY, KUSHNER, 1999; AGUIAR et al., 2013). Na forma de estrutura pentamérica cíclica, a CRP permite a sua ligação a diversas moléculas estranhas no organismo. Assim sendo, atua contra processos infecciosos, eliminação de tecidos alterados, prevenção de reações de autoimunidade e regulação da resposta

inflamatória (MOLD, 2002; VASHIST, 2016). Outro papel da CRP está ligado a capacidade de ativar o sistema do complemento pela via clássica, interagir com receptores específicos em células fagocíticas e induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (DU CLOS; MOLD, 2004; VASHIST, 2016), estimular a fagocitose e ligar-se a receptores de imunoglobulinas IgG (FcγR) (BLACK, AGRAWAL; SAMOLS, 2005). Dessa forma, a CRP comporta-se como fundamental tanto no processo pró-inflamatório quanto anti-inflamatório.

Em geral, os valores de CRP são considerados alterados quando aumentam a síntese hepática, elevando os níveis séricos acima de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. O aumento da concentração de CRP humana decorre de quatro a seis horas após o quadro de infecção, inflamação e/ou lesão tecidual (**figura 3**), com picos de concentração entre 24 a 48 horas, podendo aumentar em mais de 1000 vezes a sua concentração sanguínea, levando em consideração o tipo e a intensidade do processo patológico. Esta mudança apresenta meia-vida plasmática de 19 horas e é responsável por amplificar a resposta imune (MARNELL; MOLD; DU CLOS, 2005; PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

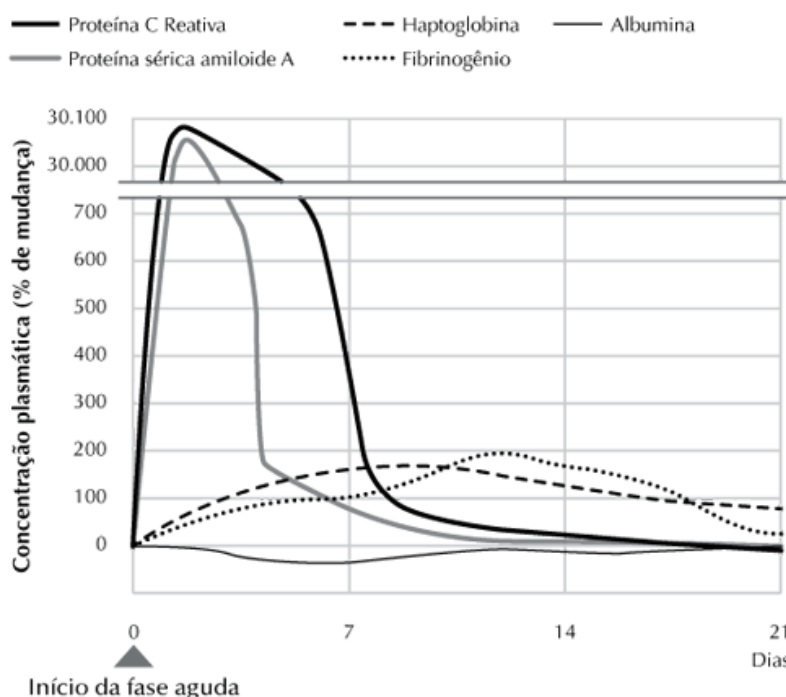


Figura 3 – Padrão de resposta de biomarcadores inflamatórios frente à lesão tecidual (Fonte: ROSA NETO; CARVALHO, 2009).

As inflamações leves e infecções virais conduzem a elevações na faixa de 10-40 mg/L de CRP, enquanto inflamações mais graves e infecção bacteriana, apresentam

concentrações séricas entre 40-200 mg/L. Alguns autores têm demonstrado que concentrações séricas entre 50 a 100 mg/L são suficientes para distinguir a sepse da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (AGUIAR et al., 2013).

Além da utilização da CRP para diagnóstico de infecção e/ou inflamação, com ou sem lesão tecidual, o monitoramento da proteína em questão, no paciente, por exemplo, evita o uso de antibióticos e/ou anti-inflamatórios indiscriminado e complicações no quadro clínico. Além disso, a CRP pode ser utilizada para sondagem pós-operatório e na evolução de tratamentos, doenças neoplásicas ou de inflamação sistêmica não infecciosa (artrite reumatoide, lúpus, politrauma, entre outras) (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

Assim sendo, a CRP se destaca pelas suas propriedades excepcionais, como estabilidade no soro ou plasma e seu comportamento imediato, a qual explica, suficientemente, por que fornece associações mais próximas e melhores previsões de infecção e inflamação do que demais marcadores. No entanto, a CRP também pode conter associações específicas com doenças cardiovasculares, em especial as associadas com a doença aterosclerótica.

1.2 Doença Aterosclerótica

Dados revelam que as doenças correlacionadas ao sistema cardiovascular (DCVs) representam uma das maiores causas de mortalidade em nível global abrangendo países desenvolvidos e em desenvolvimento (ORDUNEZ, 2011; MACKAY, et al. 2011; CANNON, 2013). No Brasil, com aproximadamente 300 mil óbitos anuais, essas doenças aparecem em primeiro lugar entre as causas de morte, representando quase um terço dos óbitos totais e 65% do total de mortes na faixa etária de 30 a 69 anos de idade (BEZERRA et al., 2009, BRASIL, 2019). Diante disso, as DCVs evidenciam uma ameaça ao desenvolvimento social e econômico, acima de tudo devido à grande proporção de óbitos que ocorrem precocemente.

Dentre o espectro de doenças cardiovasculares, aquelas correlacionadas à aterosclerose são de elevado impacto frente a sua ação, podendo ser expressa por doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e de vasos periféricos, incluindo patologias da aorta, dos rins e de membros, com relevante morbidade e impacto na qualidade de vida e produtividade da população adulta (BRASIL, 2006).

A aterosclerose assim como as doenças cardiovasculares de modo geral tem causas multifatoriais e progressivas, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares

altamente específicas (HACKMAN, ANAND, 2003). A patologia aterosclerótica, representada na **figura 4**, é uma doença inflamatória da parede arterial onde as placas ou estrias gordurosas são pontos-chaves e característicos da doença (BADIMON, STOREY, VILAHUR, 2011). O acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos na parede das artérias, formam as placas de ateroma que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (LIBBY, 2002).

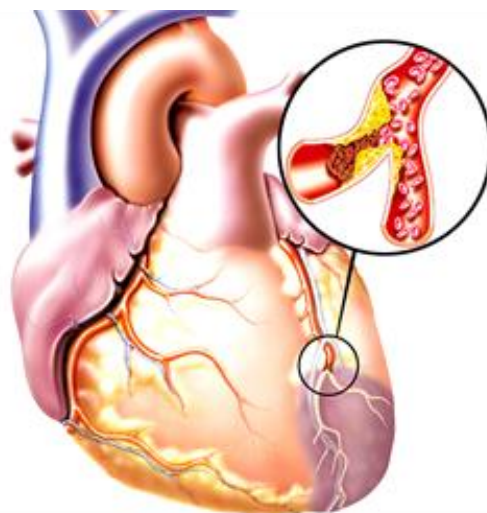


Figura 4 – Representação de uma artéria coronariana em que houve o desenvolvimento de placa aterosclerótica, modificando o fluxo sanguíneo normal (Fonte: LOOK FOR DIAGNOSIS, 2019).

Estudos primordiais têm apontado às lipoproteínas retidas, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) com um papel de destaque na etiologia da doença aterosclerótica, ainda que, alguns indivíduos desenvolvem doença cardiovascular na ausência de anormalidades no perfil dessas lipoproteínas (LIBBY 2002).

De modo geral, as doenças inflamatórias, bem como a doença aterosclerótica são estimulados e até mesmo induzidos pelos fatores de risco. Os fatores modificáveis de risco são a obesidade, colesterol, tabagismo, sedentarismo e estresse; enquanto que os fatores de risco não modificáveis são: herança genética, idade e sexo. O estabelecimento da doença cardiovascular ocorre geralmente por uma associação de um ou mais desses fatores (CARVALHO, SILVA, GUEDES, 1995). Alguns estudos têm se intensificado buscando exaltar os papéis desempenhados pelo estresse emocional e o sistema nervoso central como desencadeadores da doença, demonstrando a interligação entre conflitos psicossociais, as emoções e os padrões de comportamentos na patogênese de doenças cardiovasculares (ELIOT, 1992). De modo geral, o processo de identificação e o controle quando possível

desses geradores de DCVs constitui um fator preponderante na prevenção e tratamento dessas doenças.

Uma vez instaurada a aterosclerose, a doença inicia seu mecanismo através da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), presente na íntima arterial por espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em uma forma oxidada e imunogênica, oxLDL. Quando nas células endoteliais, a lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) induz a ativação de fatores de transcrição como o Factor nuclear kappa B (NF- κ B), aumentando a produção da Proteína de Adesão Celular Vascular 1 (VCAM-1) e a quimiocina Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1). Com o aumento exacerbado da expressão de VCAM-1 e MCP-1, há aumento também do influxo e adesão de monócitos na parede endotelial e, por conseguinte, aumento da migração dos mesmos para a íntima arterial. Após a passagem dos monócitos (diapedese), proporcionada por MCP-1, monócitos diferenciam-se em macrófagos, que nesse estado, fagocitam oxLDL (COLLINS; CYBULSKY, 2001; MOORE; TABAS, 2011). Os macrófagos por sua vez não possuem a maquinaria celular necessária para degradar a forma oxidada do LDL-c, ocorrendo dessa forma, o acúmulo no citoplasma dos macrófagos de oxLDL, assim formando a chamadas células espumosas (**Figura 5**).

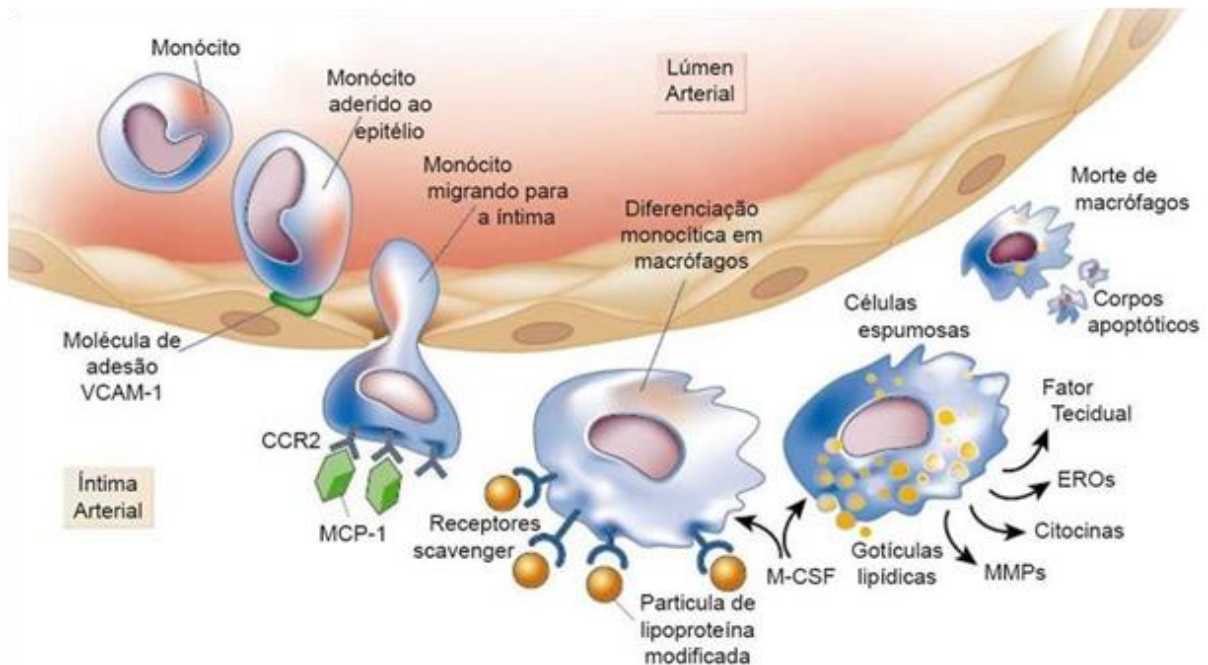


Figura 5 – Migração de monócitos na aterogênese (Adaptado de LIBBY, 2002).

Com a diferenciação de monócitos em macrófagos e posterior ativação, origina-se um processo inflamatório agudo, onde os macrófagos ativados produzem Matrix Metaloproteases (MMPs), EROs e citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 β (IL1- β), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), o que direciona a produção das estrias gordurosas (LIBBY, 2002). Além disso, estudos apontam que na presença de LDL oxidada, em especial a IL-6 gerada, estimula os hepatócitos a produzirem RNAm para produção de proteínas de fase aguda, tais como o fibrinogênio, a proteína C reativa e a proteína amilóide sérico A (DAS, 2001).

A expressão de citocinas e EROs cronifica a formação de estrias gordurosas e se intensifica pelo fato de que tais citosinas pró-inflamatórias (IL1- β e TNF- α) também ativam NF- κ B, super expressando ainda mais VCAM-1 e MCP-1. A inflamação agora com caráter crônico, começa a ter aumento no recrutamento de macrófagos, linfócitos, enzimas hidrolíticas e produção de citocinas e quimiocinas. Conjuntamente a isso, macrófagos da região da lesão também produzem fatores de crescimento, estimulando o remodelamento da musculatura lisa dos vasos, agravando ainda mais a lesão, também conhecida como ateroma (CHESTER et al., 1995; LIBBY, 2002; YOKOYA et al., 1999).

Dessa forma, após as etapas de influxo, proliferação de células mononucleadas, acúmulo de células espumosas, estimulação de musculares lisa e formação de tecido fibroso, há aumento e reestruturação da lesão (esclerose), que desenvolverá um núcleo lipídico e uma superfície fibrosa. À medida que a lesão avança, desenvolve-se estenose arterial (Figura 6), diminuindo de forma gradativa o fluxo sanguíneo arterial.

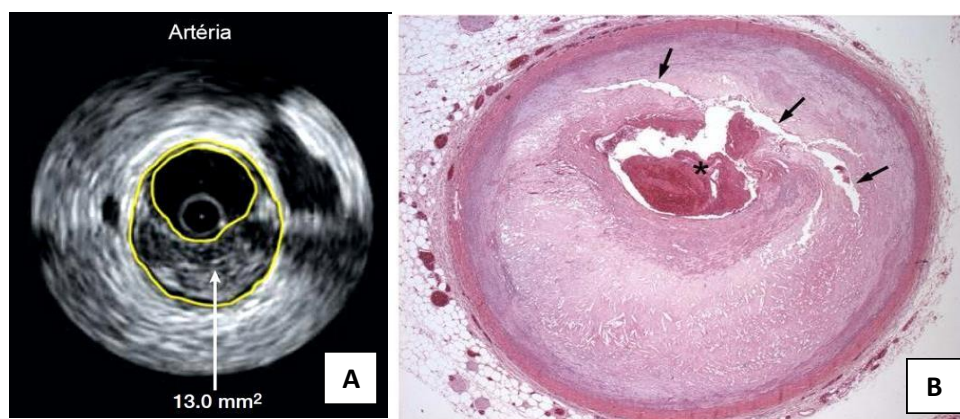


Figura 6 – (A) Ultrassonografia da artéria coronária demonstrando a progressão da lesão aterosclerótica, resultando em diminuição do lúmen arterial. (B) Corte histológico da artéria interventricular anterior evidenciando grande placa aterosclerótica, com área de ruptura (setas) e trombose luminal oclusiva (asterisco). Hematoxilina-eosina, 2,5 \times (Fonte: CHOUDHURY; FUSTER; FAYAD, 2004; RIBEIRO; YAMADA; BENVENUTI, 2014).

A aterosclerose pode causar complicações como angina, isquemia de membros, insuficiência renal e hipertensão. Além disso, a partir do momento em que a lesão aterosclerótica atinge um tamanho insustentável frente ao vaso, pode ocorrer à ruptura, da placa ou embolia trombótica nas artérias coronarianas e carótidas, evento conhecido como aterotrombose. A embolia trombótica, como já mencionada, tem como manifestações clínicas mais significativas o infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico ou morte súbita (LOBATTO et al., 2011).

Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre o risco de eventos cardiovasculares e concentrações crescentes da proteína C reativa (GILSTRAP; WANG, 2012; MONTGOMERY; BROWN, 2013), sendo essa associação observada em ambos os gêneros, em uma ampla faixa etária e em vários grupos étnicos (MADJID; WILLERSON, 2011). Sendo assim, a proteína C reativa é considerada um marcador de risco cardíaco bem estabelecido (MADJID, WILLERSON, 2011).

A partir do aprimoramento de técnicas de detecção mais sensíveis, foi possível a estratificação de categorias de risco cardíaco, de acordo com a concentração detectada de CRP. Em geral, concentrações abaixo de 1 mg/L são associadas a um baixo risco, concentrações acima de 3 mg/L são associadas a um alto risco e concentrações intermediárias a esses dois valores são associadas a um risco moderado. Valores acima de 10 mg/L são considerados anormalmente altos e o teste deve ser repetido semanas depois (MONTGOMERY; BROWN, 2013). A **Figura 7** esquematiza essa estratificação.

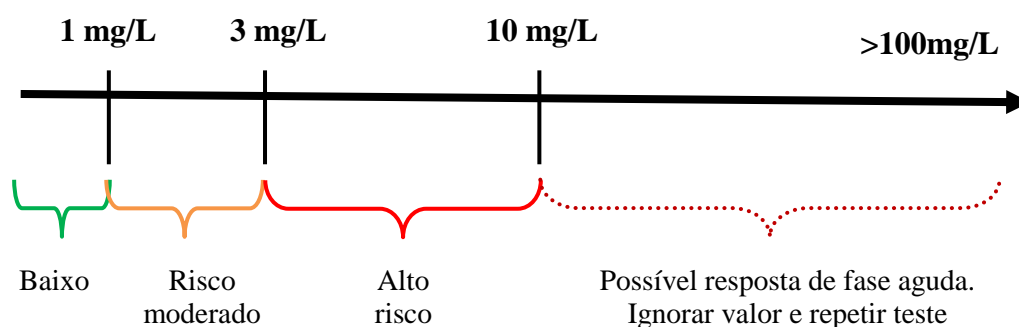


Figura 7 – Esquema da estratificação de risco cardíaco de acordo com a concentração de CRP detectada no sangue (Modificado de RIDKER, 2003).

Os estudos têm demonstrado a associação da CRP ao risco cardiovascular pela participação direta nos processos inflamatórios da aterosclerose, como por exemplo: induzindo a expressão das moléculas de adesão endoteliais (VCAM, ICAM-1, E-selectina), aumento na migração de células musculares lisas para o local da lesão endotelial, ativação da via clássica do sistema complemento, na quimiotaxia de monócitos, na ativação de citocinas e na opsonização (DEVARAJ; SINGH; JIALAL, 2009; LU *et al.*, 2012; MONTGOMERY; BROWN, 2013).

Além disso, índices anormais de CRP aumentam a captura de lipoproteína de baixa densidade (LDL, especialmente oxLDL (LDL oxidado) pelos macrófagos e facilita a formação de células espumosas em placas de ateroma. Além de auxiliar o desenvolvimento da placa, estudos demonstram que a CRP age se depositado na região da placa (LAGRAND *et al.*, 1999; PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003; ZHANG *et al.*, 1999). Ainda, a presença de CRP pode ocasionar problemas na produção de óxido nítrico, por inibição da enzima óxido nítrico sintase endotelial o que pode contribuir para episódios de vasoconstrição, pode haver também um estímulo da adesão de leucócitos e da agregação plaquetária, causando diversos problemas como oxidação, danos vascular, trombose e progressão da lesão aterosclerótica (DI NAPOLI *et al.*, 2005; KUO *et al.*, 2005; RAMASAMY, 2011). Assim sendo, a CRP tem uma magnitude de propriedades pró-inflamatórias que poderiam em potencial contribuir para a patogênese, progressão e complicações da doença aterosclerótica.

Diante do papel da CRP antes, durante e após a aterosclerose seja na prevenção da intensificação da doença, para o auxílio no diagnóstico ou monitoramento, reforça-se a necessidade de estudos que possibilitem desenvolver ou aprimorar métodos que permitam estratificar grupos de risco para que assim, seja possível resultados capazes de contribuir na cobertura de pacientes com quadro propenso a aterosclerose, no caso de instauração da patologia e no acompanhamento da evolução da mesma.

1.3 Quantificação Laboratorial de CRP

No campo clínico, a monitorização da concentração sérica da proteína C reativa permite obter informações sobre a resposta imunitária inata do organismo, podendo correlacioná-la a alguma alteração fisiológica, oriunda por exemplo da infecção, inflamação, lesão tecidual, neoplasia ou inflamação sistêmica não infecciosa.

A detecção e quantificação laboratorial da CRP no sangue baseia-se na utilização de testes imunológicos, onde os mais utilizados são: imunoturbidimetria, imunoadsorção enzimática (ELISA), radioimunoensaio, aglutinação em látex e nefelometria (ALGARRA; GOMES; SILVA, 2012.; HENNESSEY et al., 2009). Alternativas analíticas avaliam a combinação de nanopartículas e polímeros com biomoléculas nos dispositivos de detecção de biomarcadores (ALGARRA; GOMES; SILVA, 2012).

A imunoturbidimetria, uma das técnicas mais utilizada em laboratório, é uma técnica que se baseia na obtenção do soro e, por conseguinte, adição de anticorpos específicos para CRP, ocasionando a formação dos imunocomplexos. A formação destes complexos é analisada em uma espectrofotómetro a 340 nm, durante quatro minutos e meio. A turvação produzida da interação antígeno e anticorpo na passagem do foco de luz é proporcional à concentração da proteína C reativa presente no soro, obtendo-se assim, uma curva padrão com as concentrações em mg/L (ROGWOSKI et al., 2005).

No entanto, apesar das diversas opções para detecção de CRP no sangue, a grande maioria das técnicas ou métodos para dosagem do marcador, necessita de equipamentos e processamento adequados, mão-de-obra especializada e são relativamente dispendiosos (KIM et al., 2013). Além disso, os métodos atuais de detecção de CRP são totalmente automatizados e demandam certo tempo (HENNESSEY et al., 2009), o que pode interferir na melhora do quadro clínico do paciente. Diante disso, se faz necessário o desenvolvimento de métodos alternativos e práticos para a detecção da Proteína C reativa, como por exemplo, os biossensores.

2. Biossensores

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) um biossensor pode ser definido como um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas, mediadas por elementos biológicos desde enzimas isoladas, anticorpos, tecidos, organelas ou células, de forma a detectar compostos químicos, através de sinais elétricos, térmicos ou ópticos (KIM, et al., 2008; THEVENOT et al., 2001).

No caso dos dispositivos em que a reação envolve a transferência de elétrons, têm-se os biossensores eletroquímicos. Nestes, o transdutor converte a resposta do evento de reconhecimento biológico em um sinal elétrico (WANG, 2006b). Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e desenvolvidos para o uso em análises clínicas (SONG, S.; XU; FAN, 2006).

Um biossensor ao empregar um elemento biológico tende a produzir sinais mensuráveis proporcionais à concentração do analito de interesse (KIMMEL et al., 2012). O evento de reconhecimento da biomolécula de interesse é combinado a um transdutor, o responsável por converter a energia do evento que se passa na superfície em um sinal que é captado e processado (**Figura 8**) (RAPP, GRUHL, LANGE, 2010).

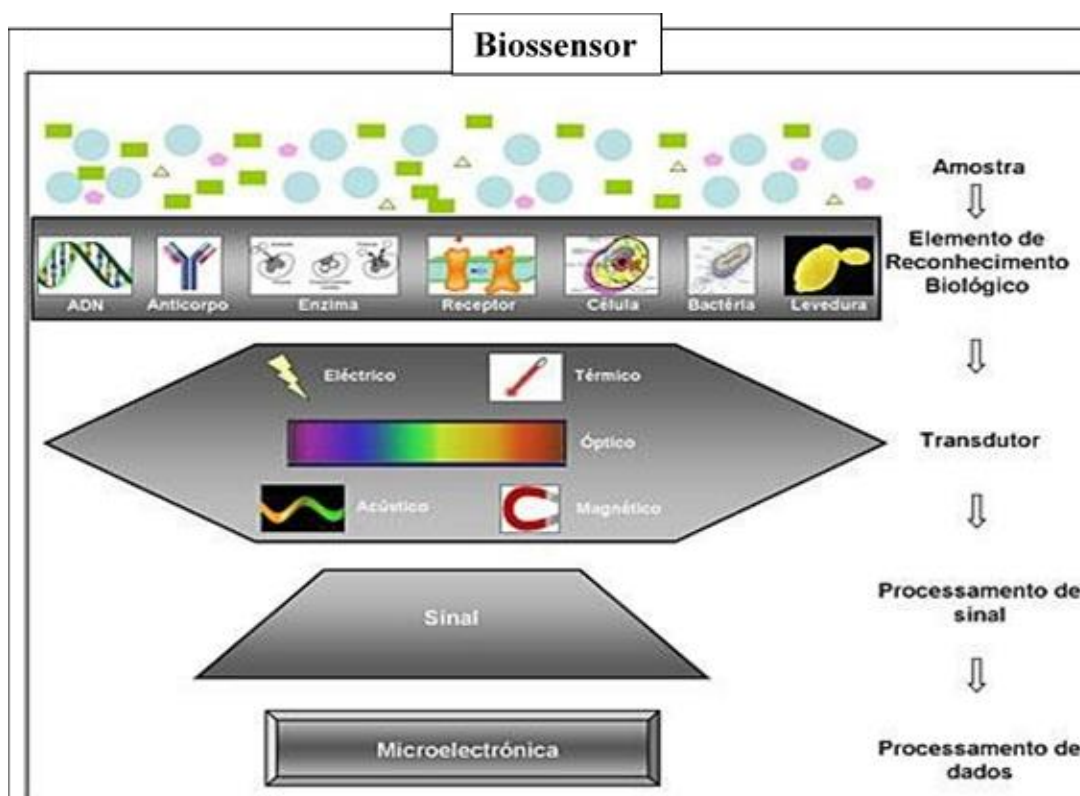


Figura 8 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor (Fonte: FERREIRA, 2005).

O primeiro biossensor desenvolvido foi registrado no século passado, sendo demonstrado por Clark e Lyons em 1962 e conhecido como “eletrodo enzimático” (CLARK; LYONS, 1962). No sensor em questão, a enzima glicose oxidase era acoplada a um eletrodo no intuito de medir a pressão parcial do oxigênio. No processo, a reação enzimática de oxidação da glicose, gera um consumo de oxigênio proporcional à concentração do substrato. A variação na pressão parcial de oxigênio era reconhecida pelo eletrodo, o que determinava a quantidade de glicose no meio (D’ORAZIO, 2003).

O sucesso na associação entre as técnicas de detecção e biomoléculas específicas possibilitou uma multidisciplinariedade de áreas de investigação em nível de biossensores acarretando desenvolvimento de tecnologias de reconhecimento molecular, sensíveis e

seletivas, com aplicações que incluem a análise clínica, ambiental, toxicológica, medicina do esporte (SADIK; ALUOCH; ZHOU, 2009), segurança alimentar, descoberta de novas drogas, controle de processos, segurança e defesa (TURNER, 2013).

Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas já existentes. Para uma maior precisão diagnóstica, torna-se necessário e oportuno o desenvolvimento tecnológico de biossensores portáteis, rápidos e sensíveis, com vista no auxílio do diagnóstico e/ou monitoramento da evolução da doença em ambientes pré-hospitalares e de urgência (LOEWENSTEIN; STAKE; CICHON, 2013).

Os biossensores de modo geral, podem ser classificados basicamente de duas formas: a primeira de acordo com o elemento de reconhecimento bioquímico, que determina a seletividade ou especificidade do dispositivo; e a segunda de acordo com o transdutor, que determina a sensibilidade do dispositivo (RAPP; GRUHL; LANGE, 2010). Em caso particular dos biossensores eletroquímicos, estes podem ser diferenciados também de acordo com o princípio de funcionamento do transdutor, classificados em potenciométricos aqueles que monitoram o potencial elétrico, em amperométricos os que monitoram a corrente elétrica ou impedimétricos os que monitoram a impedância elétrica e suas componentes: resistência e capacitância (POHANKA; SKLÁDAL, 2008).

Outra classificação importante remete ao tipo de componente biológico utilizado, que pode ser, por exemplo, uma célula, enzima, anticorpo, DNA ou até mesmo um micro-organismo. Nesse processo a ideia é que exista uma associação do biocomponente, referido como sonda, com seu respectivo alvo, se presente na amostra. (MEHRVAR, ABDI, 2004).

2.1 Imunossensores

Em meio a diferentes tipos de sensores eletroquímicos, os imunossensores representam uma classe que merece atenção especial, no que se refere a uma detecção sensível e seletiva. Um imunossensor é um dispositivo sensorial o qual é constituído por um anticorpo (ou antígeno) acoplado no transdutor, que irá mensurar a imunoafinidade (KIMMEL et al., 2012; PUIU; ZHANG; ZHAO, 2018).

Os imunossensores genericamente podem ser classificados em dois tipos: diretos e indiretos. Os imunossensores diretos possibilitam o monitoramento da interação propriamente dita entre um antígeno e um anticorpo, ou seja, são capazes de detectar uma mudança física durante a formação do imunocomplexo. Já os imunossensores indiretos

utilizam, por exemplo, mediadores ou indicadores eletroativos para a detecção (MOHAMMED; DESMULLIEZ, 2011). A **Figura 9** ilustra um imunossensor eletroquímico direto desenvolvido a partir da modificação de um eletrodo de grafite.

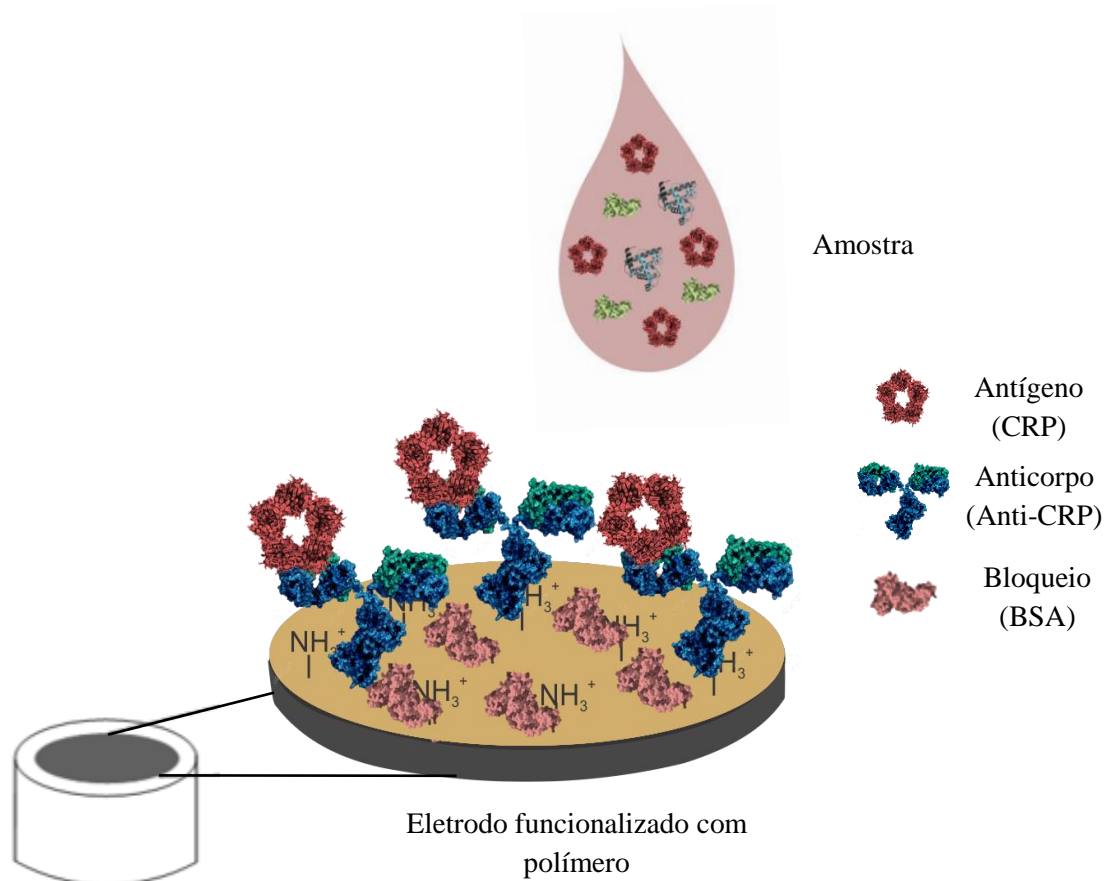


Figura 9 – Eletrodo de grafite funcionalizado com filme polimérico, anticorpo imobilizado (Anti-CRP), bloqueio (BSA) e alvo específico (CRP) interagindo com a plataforma (Fonte: autoria própria).

Alguns trabalhos divulgados recentes apontam o uso de biossensores, em muitos casos integrados a plataformas nanotecnológicas para melhora da performance do sensor, para a detecção de biomarcadores, como a proteína C reativa (D’ORAZIO, 2011). Um imunossensor impedimétrico para CRP, obteve um limite de detecção de 176 pmol L^{-1} (BRYAN et al., 2013). Diante disso, entende-se a existência de grande interesse no desenvolvimento de biossensores para detectar esse importante biomarcador.

2.2 Eletrodos quimicamente modificados

Para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, os eletrodos modificados com filmes poliméricos têm grande relevância (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015). Antes de executar uma modificação de um eletrodo, é de extrema importância uma escolha minuciosa do material do eletrodo base, uma vez que essa matriz deve apresentar características favoráveis e apropriadas para o método de imobilização selecionado.

Dentre os materiais mais utilizados como eletrodos base incluem-se ouro, platina, mercúrio, vidros condutores e carbono, este em suas mais variadas formas (carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono, grafite e carbono reticulado). Um destaque remete ao carbono grafite por seu custo reduzido, versatilidade e ampla faixa de trabalho (HOROZOVA; DODEVSKA; DIMCHEVA, 2009). Após a escolha do eletrodo base de acordo com as propriedades que se adequem à pesquisa, a modificação química poderá ser instaurada.

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) é utilizado para designar um eletrodo cuja superfície foi tratada com espécies quimicamente ativas, a fim de alterar suas propriedades, visando pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução para vários propósitos e aplicações (MOSES et al., 1975; MURRAY et al., 1987; RADI, 2010).

Há uma gama de vantagens na utilização de EQMs como, por exemplo, propiciar melhor sensibilidade, seletividade e/ou estabilidade, bem como facilitação das interações de um analito na camada modificada, eletrocatalise de reações redox, transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, permisseletividade com uso de membranas para inibir interferentes, detecção eletroquímica de analitos iônicos não redox e a incorporação de biomoléculas (PEREIRA et al. 2002).

Existem diversos mecanismos que podem ser utilizados para a modificação desses eletrodos base com espécies químicas, dentre eles alguns utilizados são a modificação com grafeno e derivados e a eletropolimerização de filmes poliméricos. Os polímeros vêm ganhando espaço, devido à variedade de monômeros disponíveis que conferem propriedades únicas atendendo a várias demandas (GUO et al. 2009; CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

2.3 Grafeno e derivados

O grafeno é caracterizado por ser um alótropo do carbono, que consiste em uma monocamada plana de átomos de carbono híbridos em sp^2 . A disposição desse material possibilita propriedades extraordinárias, em especial, uma grande área superficial, aproximadamente $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ para uma única camada, e também excelente condutividade elétrica e condutividade térmica ($K = 5 \times 10^3 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$). Diante dessas características relevantes, o grafeno pode ser utilizado em diversos campos tecnológicos, como exemplo, na nanotecnologia, na produção de nanocompósitos e no desenvolvimento de sensores e biossensores (GUO et al., 2009).

As metodologias convencionais de produção de grafeno são: o crescimento de grafeno por deposição química a vapor, a exfoliação mecânica do grafite e a oxidação química de grafite para geração de óxido de grafite seguido de exfoliação. Este último método é o mais explorado na síntese de derivados de grafeno por gerar maior quantidade de material (PUMERA, 2011).

A metodologia mais utilizada consiste na oxidação do grafite por uma mistura de ácido nítrico e de oxidantes fortes, como KMnO_4 ou KClO_3 , que origina o óxido de grafite. O óxido de grafite produzido apresenta camadas de grafite distantes entre si devido à presença de grupos funcionais de oxigênio sobre os planos basais da folha individual de grafeno. Na sequência o óxido de grafite é submetido a tratamento térmico para exfoliação, gerando o óxido de grafeno (OG) (ZHU et al., 2010).

Na estrutura do OG encontra-se grupos funcionais de oxigênio, tais como epóxidos, hidroxilas, carboxilas e grupos carbonilas localizados nas bordas e planos basais. Dessa forma, o OG pode ser disperso em água e formar uma suspensão coloidal estável por ser hidrofílico. As características do OG facilitam a fabricação de nanocompósitos com polímeros (FENG et al., 2014). A **figura 10** ilustra as etapas de preparo do OGRE a partir do grafite.

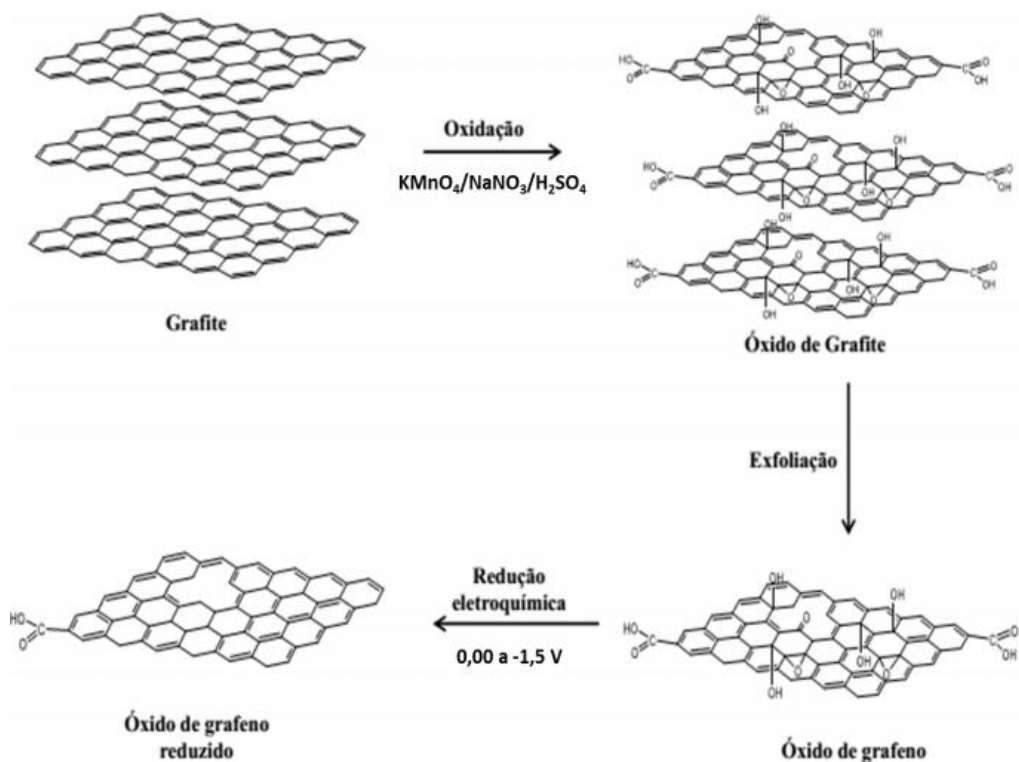


Figura 10 – Mecanismo de síntese do óxido de grafeno reduzido a partir de grafite (Fonte: DA SILVA, 2017).

O mecanismo de redução do óxido de grafeno produzido ocorre por meio de tratamento térmico ou pela redução química utilizando agentes redutores. No entanto existem desvantagens nesses mecanismos de preparação, no caso do tratamento térmico, exige equipamentos específicos para o controle das condições de preparo, como o vácuo e calor, já a redução química geralmente utiliza reagentes redutores perigosos tais como hidrazina, borohidreto de sódio ou hidretos de alumínio (ZHANG et al., 2009).

Assim sendo, redução eletroquímica torna-se interessante alternativa para a redução do OG, por ser uma técnica rápida e não utilizar solventes tóxicos, evitando a contaminação do produto final. Neste método, o elevado potencial negativo aplicado sobre o eletrodo vence as barreiras de energia para a redução dos grupos funcionais de oxigênio, como $-\text{OH}$ e $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, levando a uma redução eficaz do OG (GUO et al., 2009).

2.4 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas que possuem elevada massa molar, formadas pela união de várias moléculas menores denominadas monômeros. Os monômeros ligam-

se entre si por intermédio de ligações covalentes formando o polímero (do grego poly = muitos e meros = partes). O nome dado ao processo de formação de uma cadeia de polímero é a polimerização (BLASS, 1985).

Os polímeros constituem várias substâncias comuns do conhecimento humano, como as proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e materiais como plásticos, borrachas, tintas, nylon e poliésteres. Além disso, são amplamente utilizados na indústria automobilística, civil, de transporte, na área médica e odontológica e também podem ser utilizados como compósitos, devido à sua combinação com um ou mais materiais (NAMBIAR; YEOW 2011).

Em especial, os eletrodos modificados com polímeros condutores, têm sido extensivamente utilizados no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, para amplificar sinais e sensibilizar a superfície para a fixação da sonda. Para essa associação entre eletrodos e filmes poliméricos, uma técnica bastante utilizada é a polimerização eletroquímica, em que determinado monômero presente em uma solução forma um polímero insolúvel na superfície do eletrodo, por meio de um processo de oxirredução (RADI, 2010). As vantagens dessa técnica são a simplicidade, reprodutibilidade, estabilidade dos filmes produzidos, possibilidade de controle de espessura e morfologia, entre outras (COSNIER; HOLZINGER, 2011).

De modo geral, os polímeros condutores além das vantagens supracitadas, são interessantes para aplicações em biossensores pelo seu baixo custo, processamento simples, grande área superficial, possibilidade de imobilização de espécies ativas, bloqueio de interferentes, aumento da transferência de elétrons, da sensibilidade e da seletividade dos eletrodos e também especificidades químicas que podem orientar a interação com a biomolécula (ATES, 2013; NAMBIAR; YEOW, 2011).

Dentre a gama de possibilidades de monômeros existentes, a preparação de filmes poliméricos derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis têm sido extensamente estudados (CASTRO et al., 2008; MARTINS et al., 2011; RODRIGUES, 2014; DA SILVA et al., 2017). O interesse nestes monômeros, dentre eles a tiramina (**figura 11**), envolve principalmente sua eficiência para a aplicação em sensores biológicos. A grande vantagem destes monômeros, é que depois de estabelecida a eletropolimerização, geralmente os grupos funcionais são preservados, o que facilita a interação com o material biológico a ser imobilizado (RODRIGUES, 2014).

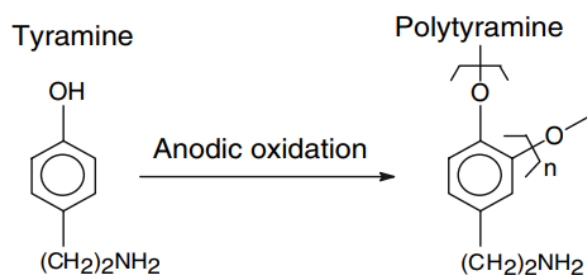


Figura 11 – Estrutura química do monômero polititamina (Fonte: autoria própria).

2.5 Nanocompósitos poliméricos

Os nanocompósitos poliméricos são compreendidos como a junção de nanomateriais como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono ou grafeno associados, por exemplo, a polímeros condutores. Estes materiais exibem propriedades de relevância no campo dos sensores eletroanalíticos, devido às suas várias características que podem melhorar o desempenho do sensor. Suas especificidades oferecem vantagens como baixo custo, propriedades eletrônicas melhoradas, processos reversíveis de dopagens e desdopagens, controle das propriedades químicas e eletroquímicas, biocompatibilidade e estabilidade ambiental (STANKOVICH et al., 2006; HU et al., 2014).

Os nanocompósitos podem ser produzidos por meio da polimerização química e/ou eletroquímica. As reações químicas costumam produzir nanomateriais em pó e podem ser produzidos em larga escala. Por outro lado, a eletropolimerização possibilita restringir as reações nas superfícies dos eletrodos, resultando em compósitos poliméricos eletrodepositados em sua superfície. Esse método eletroquímico de síntese é vantajoso porque as variáveis eletroquímicas podem ser ajustadas de forma a regular a espessura do filme na formação do nanocompósito (GANGOPADHYAY; AMITABHA, 2000).

2.6 Estratégias para a imobilização da biomolécula

A partir do instante que há uma modificação e funcionalização da superfície dos eletrodos com nanocompósitos poliméricos, têm-se um meio apto para a fixação dos biocomponentes do sensor, devido aos grupos funcionais presentes no filme polimérico.

As técnicas de imobilização mais utilizadas, tanto dos mediadores que asseguram o mecanismo de transferência eletrônica como das biomoléculas, são as interações por adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada (*cross-linking*), aprisionamento

mecânico no interior da matriz polimérica ou oclusão (*entrapment*) (ATES, 2013; PATACAS, 2007). Na **figura 12** é possível evidenciar o funcionamento das técnicas de imobilização.

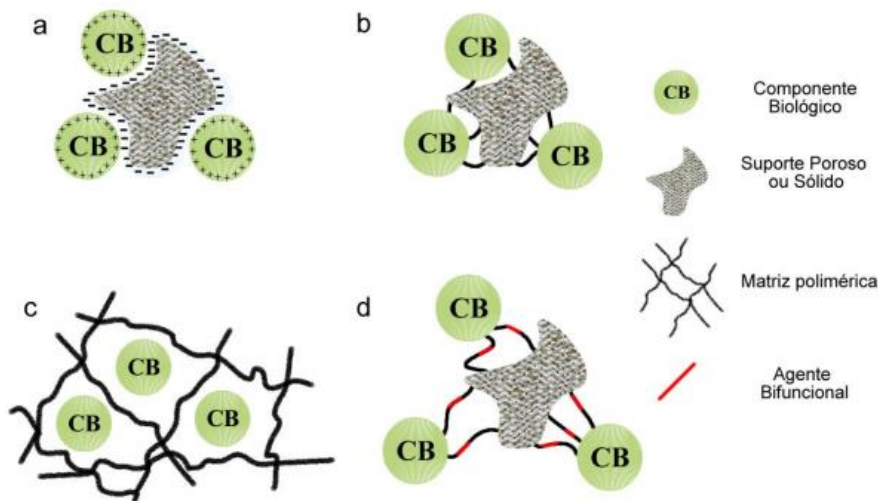


Figura 12 – Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada (Fonte: PATACAS, 2007).

A ligação covalente consiste em utilizar certos grupos químicos da biomolécula que será imobilizada que não sejam essenciais para a sua atividade biológica para interagir com a superfície do transdutor, que poderá estar funcionalizada quimicamente, por exemplo, com um polímero. A adsorção por sua vez, consiste no estabelecimento de forças atrativas de Van der Waals ou eletrostática, ligações de hidrogênio e interações iônicas. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o componente. A ligação cruzada concentra-se em uma imobilização como resultado da reação do componente biológico com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes. Por fim, não menos importante, a oclusão é outra estratégia de imobilização utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas (ATES, 2013; OLIVEIRA, et al., 2013; PATACAS, 2007).

Cabe ressaltar que independentemente do método de imobilização escolhido, devem ser considerados alguns requisitos fundamentais para o sucesso da plataforma, entre os quais a necessidade de manutenção da atividade, especificidade e estabilidade da biomolécula após a imobilização. Além disso, também deve ser considerada a simplicidade e

reprodutibilidade do método de imobilização, visando inclusive à reprodução do biossensor em larga escala.

3. Técnicas analíticas

3.1 Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas estão presentes em diversos campos do conhecimento, com o objetivo de proporcionar informações sobre propriedades intrínsecas de substâncias. O foco dessas análises é o estudo de processos de oxidação e redução em vários meios e superfícies, assim como o mecanismo de transferência de elétrons (SKOOG et al., 2014).

Uma característica marcante das técnicas eletroquímicas é a capacidade de estabelecer correlação entre a concentração do analito com grandezas elétricas mensuráveis, sendo elas a corrente, potencial, condutividade, resistência e carga (FERREIRA, 2012; RUPP; ZUMAN, 1992).

Dentre as técnicas eletroquímicas, destacam-se os métodos interfaciais dinâmicos, que investigam fenômenos na interface entre a superfície dos eletrodos e a fina camada de solução adjacente a essa superfície, na presença de corrente elétrica na célula eletroquímica. Dentre os métodos interfaciais dinâmicos, que são geralmente sensíveis, existem aqueles em que o potencial da célula eletroquímica é controlado enquanto a medida de outras variáveis é feita. Um exemplo é a voltametria, em que é medida a corrente em função do potencial elétrico (SKOOG et al., 2014).

3.1.1 Sistema Eletroquímico

Para uma análise voltamétrica, o sistema é composto por uma célula eletroquímica e por um potenciostato. A célula eletroquímica constitui-se de um recipiente que abriga a solução de eletrólito que será analisada, na qual são inseridos três eletrodos: o eletrodo de trabalho, geralmente sólido, que mede o potencial das espécies eletroativas em solução; o eletrodo de referência, o qual mensura o potencial no eletrodo de trabalho, que deve apresentar um potencial estável com o tempo, temperatura e passagem de pequenas correntes, frequentemente é constituído de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ou calomelano ($\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$); e o eletrodo auxiliar, que normalmente consiste num condutor inerte (geralmente platina), para completar o circuito (WANG, 2006a). A **figura 13** demonstra o sistema eletroquímico.

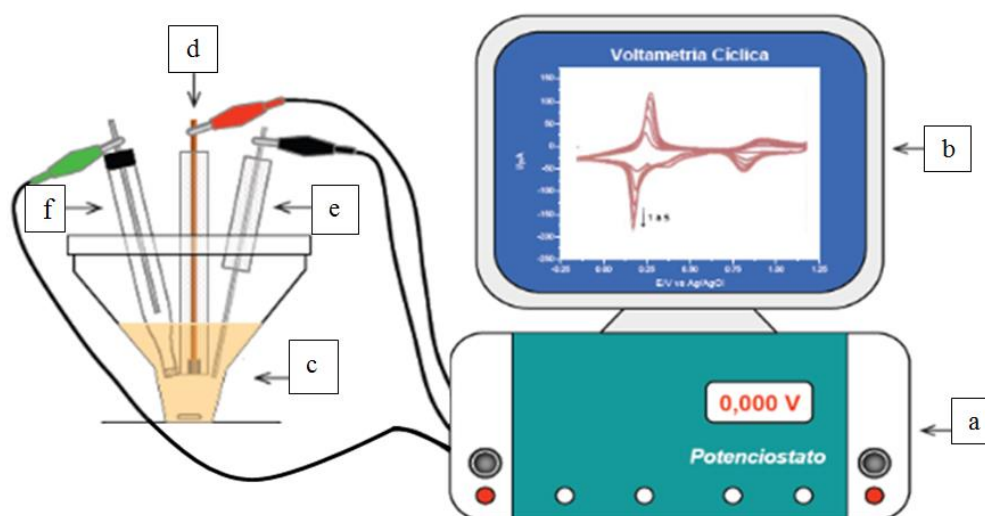


Figura 13 – Componentes de um sistema voltamétrico (a) potenciostato/galvanostato, (b) computador, (c) célula eletroquímica, (d) eletrodo de trabalho, (e) eletrodo auxiliar, (f) eletrodo de referência (Modificado de VASCONCELOS, 2014).

A solução eletrolítica contém um eletrólito de suporte para torná-la mais condutora, sendo assim capaz de permitir que a corrente migre entre os eletrodos de trabalho e auxiliar. O potenciostato é um aparelho eletrônico que será responsável por controlar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e medir a corrente que o atravessa (SILVA, 2004).

Na voltametria, por intermédio também do potenciostato, será possível variar o sinal de excitação de potencial aplicado a um eletrodo de trabalho, variando também a resposta de corrente produzida. Cada sinal de excitação relaciona-se a uma forma de onda característica, dessas surgem às chamadas técnicas de Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial (SKOOG et al., 2014).

3.1.2 Voltametria cíclica

A técnica eletroquímica de voltametria cíclica (VC) tem por finalidade varrer de forma linear o potencial de um eletrodo de trabalho (WANG, 2006a), usando uma forma de onda como mostra a **figura 14**. Desse modo, o potencial é variado linearmente de A até B. Em seguida, quando o extremo B é atingido, a direção é invertida e o potencial é novamente variado até o valor inicial A. O ciclo de varreduras tem uma velocidade específica e pode ser repetido (SKOOG et al., 2014).

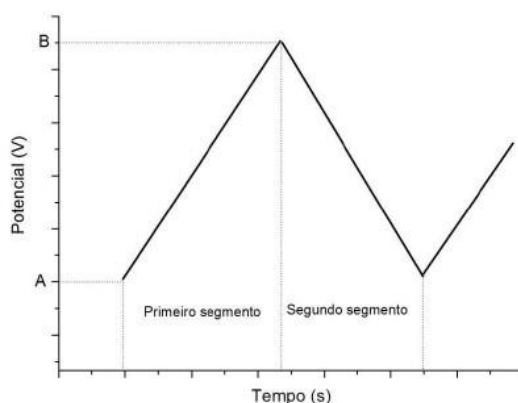


Figura 14 – Forma de onda característica da VC, com potencial elétrico em função do tempo. Cada ciclo é composto por dois segmentos: um que varia o potencial de A a B e outro que vai de B a A (Fonte: RODOVALHO, 2014).

O gráfico resultante, de corrente em função do potencial, é chamado voltamograma cíclico. Ao considerar que a forma reduzida de um analito qualquer se encontra presente na solução inicialmente, o primeiro meio-ciclo será obtido a partir de uma varredura em direção a potenciais mais positivos (catódicos). Durante essa varredura, será atingido um potencial característico do processo redox, em que uma corrente anódica começa a aumentar, até atingir um pico, e depois decair. Ao término da varredura, ocorrerá uma inversão, de modo que o segundo meio-ciclo será em direção a potenciais mais negativos (anódicos). As moléculas que antes foram oxidadas no primeiro meio-ciclo serão agora reduzidas no segundo e o perfil da resposta será similar à do primeiro meio ciclo, caso o processo seja reversível (SKOOG et al., 2014).

Na **Figura 15** é possível evidenciar um exemplo típico de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo ao potencial +0,3V e um pico de redução próximo ao potencial +0,2V.

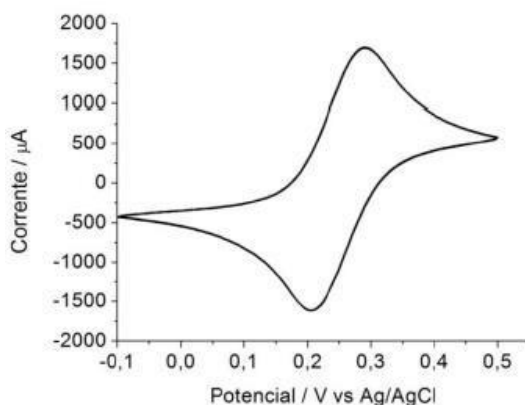


Figura 15 – Exemplo de voltamograma cíclico, demonstrando os picos de oxidação e de redução (Fonte: RODOVALHO, 2014).

A VC tem sido abundantemente usada em estudos de mecanismos de reações, de processos de adsorção e aplicações quantitativas. O formato obtido do voltamograma, incluindo o potencial em que aparecem os picos de corrente anódica e catódica, bem como a área e altura desses picos, geralmente são o meio da interpretação dos experimentos (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

3.1.3 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica bastante difundida que surgiu com o objetivo de superar as limitações da tradicional voltametria de varredura linear (SKOOG et al., 2014). Para compreensão desta técnica é importante ressaltar previamente os conceitos de corrente faradaica e não faradaica.

Durante a condução de corrente elétrica na interface eletrodo-solução dois tipos de processo são vislumbrados. Um desses processos remete a cada elétron proveniente de um circuito externo que chega à superfície do eletrodo podendo permanecer na superfície, aumentando a carga na região (chamado processo não-faradaico ou capacitativo), e outro no qual o elétron pode sair da superfície, e ser transferido para uma espécie na solução (faradaico). Os processos faradaicos baseiam-se na transferência direta de elétrons por meio de um processo de oxirredução. Por outro lado, esses processos podem ser impedidos pela termodinâmica ou cinética das reações. Nessas circunstâncias, as superfícies dos eletrodos podem comportar-se como placas de um capacitor, caracterizando os processos não-faradaicos (SKOOG et al., 2014).

Diante disso, a voltametria de pulso tem por finalidade realizar a medida de corrente em um momento em que é grande a diferença entre corrente faradaica (desejada) e a corrente não-faradaica (interferente) (SKOOG et al., 2014). Dessa forma, os potenciais são aplicados na forma de pulsos e a corrente é medida algum tempo após a aplicação, quando a corrente não-faradaica tiver decaído (WANG, 2006a). A **Figura 16** esquematiza graficamente a variação de potencial de acordo com o tempo.

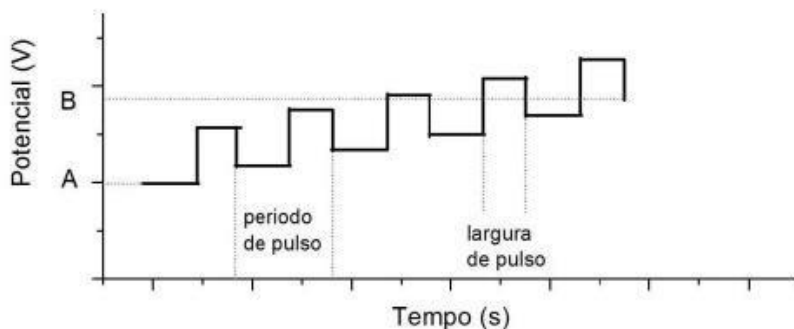


Figura 16 – Forma de onda característica da voltametria de pulso diferencial. As leituras de correntes são feitas antes e depois de cada pulso e a diferença entre elas é registrada em função do potencial (Fonte: RODOVALHO, 2014).

No caso da VPD, as medidas de corrente são feitas alternadamente: uma anterior ao pulso (i_1) e outra no fim do pulso (i_2). A diferença de corrente é gravada como uma função do potencial de excitação aplicado, que aumenta linearmente. Assim, o resultado é uma curva diferencial, consistindo em um pico cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito (**Figura 17**). A principal vantagem da técnica é a sua grande sensibilidade (SKOOG et al., 2014).

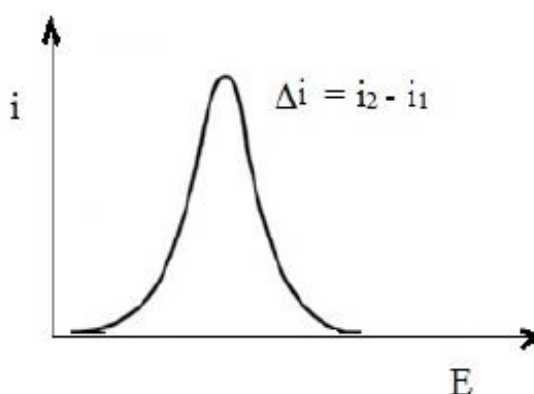


Figura 17 – Exemplo de voltamograma de pulso diferencial (Fonte: SILVÉRIO, 2015).

O potencial do pico pode ser utilizado para identificar espécies, inclusive aquelas com potencial redox similar, devido à boa resolução da técnica (OZEL; HAYAT; ANDREESCU, 2015).

3.1.4 Impedância

A adição das biocamadas na superfície dos eletrodos podem ser monitoradas e avaliadas por meio de alterações na capacitância e resistência à transferência de carga, caracterizando a técnica de análise por impedância (BONANNI et al., 2006).

A espectroscopia de impedância eletroquímica 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). A representação gráfica da técnica é realizada por intermédio de um diagrama de Nyquist, (**figura 18**) em que dados relativos a diversas frequências são representados em um plano complexo de impedância que extrapola os valores imaginários de impedância (Z'') em função dos valores reais (Z').

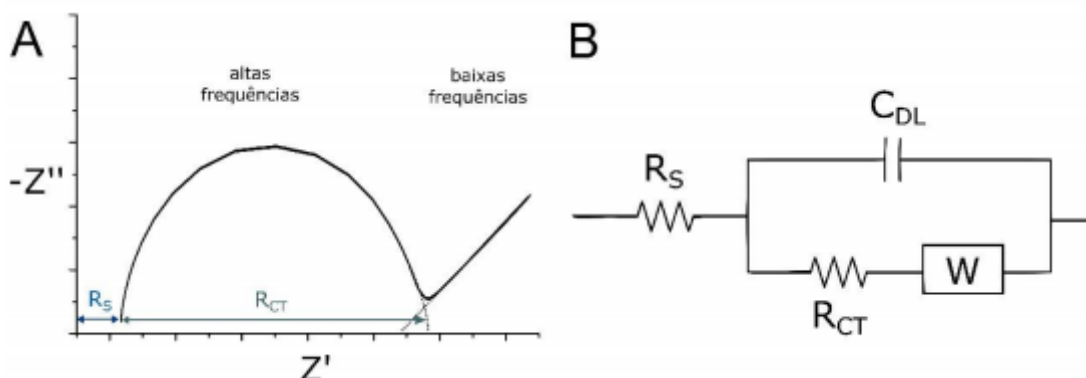


Figura 18 – Espectroscopia de impedância eletroquímica (A) Representação do diagrama de Nyquist. (B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Os dados obtidos por esta técnica são analisados mediante um modelo teórico de circuito elétrico, o qual possui elementos que representam a resistência da solução (R_S), resistência ao transporte de carga (R_{CT}), capacitância entre o eletrodo e os íons carregados na solução (C_{dl}), e impedância devido à taxa de difusão do composto redox até o eletrodo (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

3.2 Técnicas de análise morfológica

3.2.1 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM) é uma técnica de grande utilidade que possibilita a obtenção de imagens reais, em três dimensões, da topografia de uma superfície, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas (MAVER et al., 2016).

O princípio do funcionamento do AFM consiste em uma alavanca (cantilever), uma ponta (tip), um fotodetector, o laser e um “scanner” que fornece a movimentação nas três direções espaciais onde a amostra é colocada. O feixe do laser incide na parte de trás do

microcantilever e sua deflexão é captada por um detector fotodiodo. A ponta do AFM varre a amostra próxima à superfície (**Figura 19**) por meio da interação entre átomos da ponta com átomos da superfície, levando o cantilever a oscilar verticalmente de acordo com o tipo de força ou interação experimentada, atração ou repulsão. Desta forma, o fotodetector registra essas variações ocorridas e esse sinal é enviado para um computador (MAVER et al., 2016). 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).

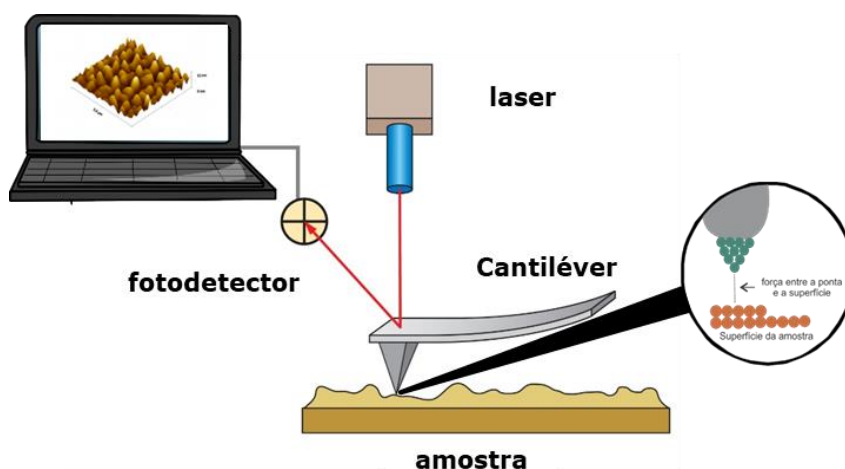


Figura 19 – Esquema do funcionamento do microscópio de força atômica (Fonte: Autoria própria).

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. 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 importância do AFM, em especial no campo dos biossensores, se deve ao fato de que essa técnica permite a caracterização das propriedades interfaciais dos eletrodos de trabalho, possibilitando a observação direta da morfologia da superfície e consequentemente, da superfície dos eletrodos modificados com moléculas biológicas (FERREIRA, YAMANAKA, 2006). Assim sendo, o microscópio de força atômica

possibilita observar modificações e biointeração do tipo antígeno-anticorpo, proteína-carboidrato, hibridização de fitas de DNA por meio dos aspectos morfológicos.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura, representada na **figura 20**, baseia-se em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que possibilitará a exploração da superfície da amostra, fornecendo o sinal do detector para uma tela catódica cuja varredura é sincronizada com aquela do feixe incidente (DEDAVID et al., 2007).

A maioria dos equipamentos utilizam como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Este feixe é focalizado sobre a amostra por meio de uma série de três lentes e com a interação do feixe com a amostra elétrons e fótons serão produzidos e coletados por detectores e convertidas em um sinal de vídeo, propiciando a formação da imagem com aparência tridimensional obtidas por um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), como evidenciado na **figura 20** (DEDAVID et al., 2007). A técnica em questão, permite caracterizar microestruturalmente diferentes tipos de materiais (CASTRO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017).

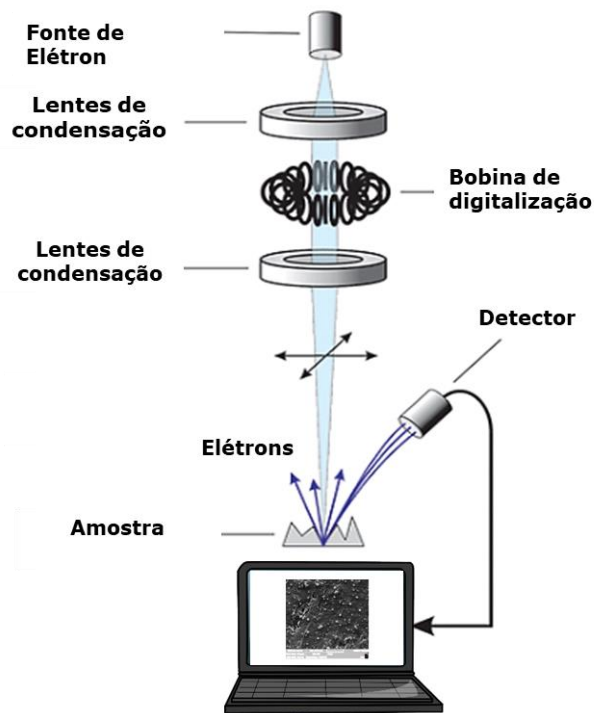


Figura 20 – Esquema do funcionamento do microscópio eletrônico de varredura (Fonte: Autoria própria).

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um imunossensor eletroquímico para a detecção e quantificação de proteína C reativa por meio da imobilização de um anticorpo (anti-CRP) específico (imunossensor) sobre eletrodos de grafite modificados com óxido de grafeno reduzido e politiramina.

4.2 Objetivos específicos

- ❑ Incorporar o nanomaterial óxido de grafeno sobre eletrodo de grafite e reduzi-lo eletroquimicamente;
- ❑ Eletropolimerizar a tiramina sobre o eletrodo de grafite (EG) modificado com óxido de grafeno reduzido (EG/OGre);
- ❑ Caracterizar eletroquimicamente o eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido/politiramina (OGre/PTir);
- ❑ Imobilizar o anticorpo (anti-CRP) sobre a plataforma desenvolvida EG/OGre/PTir;
- ❑ Detectar o alvo CRP, em soro humano, com o biossensor desenvolvido por meio de voltametria de pulso diferencial;
- ❑ Detectar o antígeno, Proteína C Reativa (CRP) em soro saudável e não saudável, sobre a superfície da plataforma desenvolvida;
- ❑ Caracterizar morfologicamente as superfícies da plataforma sensibilizada com sonda (anti CRP), sonda/bloqueio (BSA) e sonda/BSA/alvo (CRP) por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ❑ Construir a curva analítica a partir dos voltamogramas de detecção direta e determinação de limites de detecção e quantificação;
- ❑ Detectar a CRP em amostras de soro de indivíduos com concentrações normais e elevadas;
- ❑ Avaliar a estabilidade e capacidade de regeneração após lavagem do imunossensor;
- ❑ Comparar os dados obtidos de quantificação de CRP do imunossensor com dados de quantificação laboratorial.

Referências

AGUIAR, F. J. B. et al. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 1, p. 85–92, jan. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302013000100016>

ALGARRA, M.; GOMES, D.; ESTEVES DA SILVA, J. C. G. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 415, p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.007>

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. <https://doi.org/10.1002/wnan.104>

ATES, M. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 4, p. 1853-9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.035>

BADIMON, L.; STOREY, R. F.; VILAHUR, G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 105, n. 5, p. S34–42, 2011. <https://doi.org/10.1160/THS10-11-0717>

BAIDOSHVILI, A.; NIJMEIJER, R.; LAGRANDE, W. K.; HACK, C. E.; NIESSEN, H. W. Localisation of C reactive protein in infarcted tissue sites of multiple organs during sepsis. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 2, p. 152-3, 2002. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.2.152>

BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical dictionary**. 1. Ed. Leipzig: Editora Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74598-3>

BEZERRA, D. S.; SILVA, A. S.; CARVALHO, A. L. M. Avaliação das características dos usuários com hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus em uma Unidade de Saúde Pública, no município de Jaboatão dos Guararapes-PE, BRASIL. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 30, n. 1, p. 56-60, 2009.

BLACK, S.; AGRAWAL, A.; SAMOLS, D. The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 16, p. 1045–1054, jun. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00031-2)

BLASS, A. **Processamento de Polímeros**. Série didática. Editorial da UFSC, 1985.

BONANNI, A.; ESPLANDIU, M. J.; PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S.; DEL VALLE, M. Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 7, p. 1195-201, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0558-3>

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). **Coefficiente de mortalidade por doenças do aparelho circulatório**. Disponível em <<http://www.proadess.icict.fiocruz.br/index.php?pag=res1>>. Acesso em 02 jan de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Prevenção clínica da doença cardiovascular, cerebrovascular e renal crônica**. Cadernos de Atenção Básica, Normas e Manuais Técnicos, série A, n. 14, p. 56, 2006.

BRYAN, T.; LUO, X.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosens Bioelectron**, v. 39, n. 1, p. 94-8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.051>

CANNON, B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. S2-3, 2013. <https://doi.org/10.1038/493S2a>

CARVALHO, T.; SILVA, J. G.; GUEDES, D. P. Atividade Física e Saúde. **Coordenação de Doenças Crônicas Degenerativas: Orientações Básicas sobre Atividade Física e Saúde para Usuários**. Brasília: Ministério da Saúde, Ministério da Educação e do Desporto, 1995.

CASTRO, C.M.; VIEIRA, S.N.; GONÇALVES, R.A.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Electrochemical and morphological studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **Journal Materials of Science**, n. 43, 475-482, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

CASTRO, A. C. H.; FRANCA, E. G.; DE 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. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>

CAVAILLON, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 149, p. 45–53, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.016>

CAVAILLON, J.M. **Les cytokines**. Paris: Masson, 1996.

CHESTER, M. R.; CHEN, L.; TOUSOULIS, D.; POLONIECKI, J.; KASKI, J. C. Differential progression of complex and smooth stenoses within the same coronary tree in men with stable coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 25, n. 4, p. 837–842, 1995. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)00472-3](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)00472-3)

CHILLAWAR, R. R.; TADI, K. K.; MOTGHARE, R. V. Voltammetric techniques at chemically modified electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 399-418, 2015. <https://doi.org/10.1134/S1061934815040152>

CHOUDHURY, R. P.; FUSTER, V.; FAYAD, Z. A. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 913-25, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrd1548>

CLARK, L. C., JR.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann N Y Acad Sci**, v. 102, p. 29-45, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, v. 107, n. 3, p. 255-64, 2001. <https://doi.org/10.1172/JCI10373>

COSNIER, S.; HOLZINGER, M. Electrosynthesized polymers for biosensing. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 5, p. 2146-56, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0cs00090f>

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19-20, p. 1749-61, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.025>

DA SILVA, H. S. **Desenvolvimento de imunossensor para detecção do hormônio tireoideano L-triiodotironina (L-T3)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

DA SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 21, n. 7, p. 2129-2139, jul. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>

DAS, U. N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, n. 11-12, p. 953-66, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00672-4)

DEVARAJ, S.; SINGH, U.; JIALAL, I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. **Clin Chem**, v. 55, n. 2, p. 229-38, 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108886>

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. EDIPUCRS, Porto Alegre, v 1, 2007.

DI NAPOLI, M. et al. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP

Pooling Project members. **Stroke**, v. 36, n. 6, p. 1316-29, 2005. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000165929.78756.ed>

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00241-9)

DU CLOS, T. W.; MOLD, C. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. **Immunol Res**, v. 30, n. 3, p. 261-77, 2004. <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:261>

ELIOT, R. S. **Estresse e o Coração: mecanismos, avaliação, cuidados**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992.

FENG, H., WANG, B., TAN, L., CHEN, N., WANG, N., CHEN, B. Polypyrrole/hexadecylpyridinium chloride-modified graphite oxide composites: Fabrication, characterization, and application in supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 246, p.621- 628, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.08.002>

FERREIRA, A. A. P. E.; YAMANAKA, H. Microscopia de Força Atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, vol. 29 n. 1, p. 137-142, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100024>

FERREIRA, A. P. M. **Determinação de ácido α -lipóico sobre eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto**, Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Química, São Luiz, 2012.

FERREIRA, L. F. **Biosensor amperométrico à base de tirosinase na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais**. Uberlândia: Universidade Federal da Uberlândia - Instituto de Química, 2005.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 11 fev. 1999. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>

GANGOPADHYAY, R.; AMITABHA, D. E. Conducting polymer nanocomposites: A brief overview. **Chemistry of Materials**, v.12, p. 608-622, 2000. <https://doi.org/10.1021/cm990537f>

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 1803, p. 57–79, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5

GILSTRAP, L. G.; WANG, T. J. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. **Clin Chem**, v. 58, n. 1, p. 72-82, 2012. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.165712>

GUO, H. L., WANG, X. F., QIAN, Q. Y., WANG, F. B., and XIA, X. H. A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets. **American Chemical Society**, v.3, n. 9, p. 2653–2659, 2009. <https://doi.org/10.1021/nn900227d>

HACKAM, G. D.; ANAND, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**. n. 290, p. 932-40, 2003. <https://doi.org/10.1001/jama.290.7.932>

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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.009>

HOROZOVA, E.; DODEVSKA, T.; DIMCHEVA, N. Modified graphites: application to the development of enzyme-based amperometric biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 2, p. 260-4, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.09.003>

HU, K.; KULKARNI, D. D.; CHOI, I.; TSUKRUK. V. V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. *Progress in Polymer Science*, V. 39, p. 1934–1972, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001>

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

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1-68, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>

KIM, C. H. et al. CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system. **Biosensors & bioelectronics**, v. 41, p. 322–7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.047>

KIM, G. Y.; SHIM, J.; KANG, M. S.; MOON, S. H. Preparation of a highly sensitive enzyme electrode using gold nanoparticles for measurement of pesticides at the ppt level. **J Environ Monit**, v. 10, n. 5, p. 632-7, 2008. <https://doi.org/10.1039/b800553b>

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical sensors and biosensors. **Anal Chem**, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2012. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>

KUO, H. K.; YEN, C. J.; CHANG, C. H.; KUO, C. K.; CHEN, J. H.; SOROND, F. Relation of C-reactive protein to stroke, cognitive disorders, and depression in the general

population: systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 4, n. 6, p. 371-80, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70099-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70099-5)

LAGRAND, W. K.; VISSER, C. A.; HERMENS, W. T.; NIESSEN, H. W.; VERHEUGT, F. W.; WOLBINK, G. J.; HACK, C. E. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? **Circulation**, v. 100, n. 1, p. 96-102, 1999. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.1.96>

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868–74, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01323>

LOBATTO, M. E.; FUSTER, V.; FAYAD, Z. A.; MULDER, W. J. M. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, p. 835–852, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrd3578>

LOEWENSTEIN, D.; STAKE, C.; CICHON, M. Assessment of using fingerstick blood sample with i-STAT point-of-care device for cardiac troponin I assay. **Am J Emerg Med**, v. 31, n. 8, p. 1236-9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.04.031>

LOOK FOR DIAGNOSIS. **OMNI CCNI medicina diagnóstica**. Disponível em <https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Doen%C3%A7a+da+Art%C3%A9ria+Coronariana&lang=3>. Acesso em: 12 de jan. 2019.

LU, J.; MARJON, K. D.; MOLD, C.; DU CLOS, T. W.; SUN, P. D. Pentraxins and Fc receptors. **Immunol Rev**, v. 250, n. 1, p. 230-8, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01162.x>

MARTINS, P. O. **Síntese, caracterização e aplicação do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) no desenvolvimento de biossensor para detecção de marcador cardíaco**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

MACKAY, J.; MENSAH, G. A.; MENDIS, S.; GREENLUND, K. **The atlas of heart disease and stroke**: World Health Organization; **MEDICC Rev**, v. 13, n. 4, p. 6-10, 2011.

MADJID, M.; WILLERSON, J. T. Inflammatory markers in coronary heart disease. **Br Med Bull**, v. 100, p. 23-38, 2011. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr043>

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. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.014>

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 1113–1126, 2004. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>

- MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab Chip**, v. 11, n. 4, p. 569-95, 2011. <https://doi.org/10.1039/C0LC00204F>
- MOLD, C. et al. C-Reactive Protein Mediates Protection from Lipopolysaccharide Through Interactions With Fc R. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 7019–7025, 15 dez. 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.7019>
- MONTGOMERY, J. E.; BROWN, J. R. Metabolic biomarkers for predicting cardiovascular disease. **Vasc Health Risk Manag**, v. 9, p. 37-45, 2013. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S30378>
- MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-55, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>
- MOSES, P. R.; WIER, P.; MURRAY, R. W.; Chemically Modified Tin Oxide Electrode, **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975. <https://doi.org/10.1021/ac60362a043>
- MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A.; Chemically Modified Electrodes: Molecular Design for Electroanalysis; **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 379-390, 1987. <https://doi.org/10.1021/ac00132a721>
- NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosens Bioelectron**, v. 26, n. 5, p. 1825-32, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.046>
- ORDUNEZ, P. Cardiovascular health in the Americas: facts, priorities and the UN high-level meeting on non-communicable diseases. **MEDICC Rev**, v. 13, n. 4, p. 6-10, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1555-79602011000400003>
- OUCHI, N. Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. **Circulation**, v. 107, n. 5, p. 671-674, 2003. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000055188.83694.B3>
- OZEL, R. E.; HAYAT, A.; ANDREESCU, S. Recent Developments in Electrochemical Sensors for the Detection of Neurotransmitters for Applications in Biomedicine. **Anal Lett**, v. 48, n. 7, p. 1044-1069, 2015. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.976867>
- PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, 2003. <https://doi.org/10.1172/JCI18921>

PEREIRA, A. C., SANTOS, A. S., KUBOTA L. T. Tendências em Modificações de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroalíticas, **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600019>

POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 6, p. 57–64, 2008. <https://doi.org/10.32725/jab.2008.008>

PUMERA, M. Graphene in biosensing. **Materials Today**. V. 14, N. 7-8, p. 308-315, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70160-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70160-2)

PUIU, M.; BALA, C. Peptide-based biosensors: From self-assembled interfaces to molecular probes in electrochemical assays. **Bioelectrochemistry**, v. 120, p. 66-75, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.11.009>

RADI, A. E. Recent updates of chemically modified electrodes in pharmaceutical analysis. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 13, n. 8, p. 728–752, 2010. <https://doi.org/10.2174/138620710791920338>

RAMASAMY, I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 15-16, p. 1279–1296, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.003>

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LANGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 6, p. 2403-12, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3906-2>

RIBEIRO, N. W.; YAMADA, A. T.; BENVENUTI, L. A. Caso 4/2014 - Homem de 66 Anos com Infarto Agudo do Miocárdio e Morte em Assistolia após Angioplastia Coronária Primária. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 103 n.3, São Paulo, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20140129>

RIDKER, P. M. Cardiology Patient Page. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. e81-5, 2003. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093381.57779.67>

RODOVALHO, V. R. **Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN**, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, p.22-26, 2014.

RODRIGUES, L.P.; FERREIRA, D.C.; SONODA, M.T.; ABRAHÃO, O.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J.M. Electropolymerization mechanisms of

hydroxyphenylacetic acid isomers. **Journal of Molecular Structure**, n. 1072, p. 298-306, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.031>

ROGOWSKI, O. et al. Introducing the wide range C-reactive protein (wr-CRP) into clinical use for the detection of microinflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 151–158, 1 ago. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.02.024>

ROSA NETO, N. S.; CARVALHO, J. F. DE. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 4, p. 413–430, ago. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042009000400008>

RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarographic determinacion of somes pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin, **J. Agric. Food. Chem**, v. 40, p. 2016-2021, 1992. <https://doi.org/10.1021/jf00022a056>

SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosens Bioelectron**, v. 24, n. 9, p. 2749-65, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.003>

SHIELS, M. S. et al. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 105, n. 24, p. 1871–1880, 18 dez. 2013. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt309>

SILVA, J. J. B. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezoelétrico de DNA para diagnósticos clínicos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **Int J Nanomedicine**, v. 4, p. 433–440, 2006. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.433>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 9th. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2014.

STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; DOMMETT, G. H. B.; KOHLHAAS, K. M.; ZIMNEY, E. J.; STACH, E. A. et al. Graphene-based composite materials. **Nature**; v. 442, p.282–286, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04969>

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, jan. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

TILLET, W. S.; FRANCIS, T. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. **J Exp Med**, v. 52, n. 4, p. 561-71, 1930. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 8, p. 3184-96, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>

VASCONCELOS, W. S. **Determinação de metais pesados em méis de abelha de algumas mesorregiões do estado de pernambuco por voltametria de redissolução anódica**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

VASHIST, S. K. et al. Bioanalytical advances in assays for C-reactive protein. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 3, p. 272–290, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.010>

VENUGOPAL, S. K.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Macrophage Conditioned Medium Induces the Expression of C-Reactive Protein in Human Aortic Endothelial Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 1265-1271, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62345-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62345-0)

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3rd. ed. Hoboken, NJ: Wiley-VCH, p. 250, 2006a.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 21, n. 10, p. 1887-92, 2006b. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027>

YASOJIMA, K.; SCHWAB, C.; MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 1039-51, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64051-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64051-5)

YOKOYA, K. et al. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year. **Circulation**, v. 100, n. 9, p. 903-9, 1999. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.9.903>

ZHANG, Y. X.; CLIFF, W. J.; SCHOEFL, G. I.; HIGGINS, G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 145, n. 2, p. 375-9, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00105-7)

ZHANG, Z., YAN, J., JIN, H., and YIN, J. Tuning the reduction extent of electrochemically reduced grapheneoxide electrode film to enhance its detection limit for voltammetric analysis. **Electrochimica Acta**, v.139, p. 232–237, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.159>

ZHU, Y.; MURALI, S.; CAI, W.; LI, X.; SUK, J. W.; POTTS, J. R.; RUOFF, R. S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, **Properties, and Applications**. **Advanced Materials**, v. 22, p. 3906–3924, 2010. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>

CAPÍTULO 2

PROPOSAL OF A REUSABLE IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF C-REACTIVE PROTEIN IN HUMAN SERUM

O capítulo 2 está de acordo com as normas da revista International Journal of Biological
Macromolecules

(<https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-biological-macromolecules>)

**Proposal of a reusable immunosensor for detection of C-reactive protein
in human serum**

Sandro H. D. Ribeiro^a, Lívia M. Alves^b, José M. R. Flauzino^b, Anna C. R. Moço^b, Mônica
S. Segatto^c, Jonathan P. Silva^d, Juliana V. de Paiva^d, João M. Madurro^c, Ana G. B.
Madurro^{b*}

^a Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 38400-902, Brazil.

^b Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 38400-902, Brazil.

^c Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 38400-902, Brazil.

^d Sabin Medical Diagnostic, Uberlândia, 38400-106, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed: Ana G. B. Madurro

Tel./Fax.: +55 34 32258437

E-mail: agbritto@ufu.br

Abstract

This work describes the preparation of a reusable electrochemical immunosensor based in modified carbon electrode with reduced graphene oxide and polytyramine for the detection of C-reactive protein (CRP) in serum. This immunosensor was able to distinguish different concentrations of CRP in human serum by differential pulse voltammetry, with a detection limit of $0.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ and quantification limit of $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Analyses by atomic force microscopy, scanning electron microscopy and electrochemical impedance spectroscopy corroborated with voltammetric analysis. The immunosensor showed selectivity, regeneration capacity and stability, being a promising platform for *point-of-care* quantification of CRP.

Keywords: biosensor, graphite electrode, inflammation, nanocomposite, polytyramine, reduced graphene oxide.

Resumo

Este trabalho descreve a preparação de um imunossensor eletroquímico reutilizável baseado em eletrodo de carbono modificado com óxido de grafeno reduzido e politiramina para a detecção da proteína C reativa (CRP) no soro. Este imunossensor foi capaz de distinguir diferentes concentrações de CRP em soro humano por voltametria de pulso diferencial, com limite de detecção de $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Análises por microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de impedância eletroquímica corroboraram com a análise voltamétrica. O imunossensor apresentou seletividade, capacidade de regeneração e estabilidade, sendo uma plataforma promissora para quantificação de CRP em *point-of-care*.

Palavras-chave: biossensor, eletrodo de grafite, inflamação, nanocompósito, óxido de grafeno reduzido, politiramina.

1. INTRODUCTION

C-reactive protein (CRP), a member of the pentraxin family, is known as a systemic marker of inflammation and tissue damage of high sensitivity [1] and its production occurs mainly by hepatocytes, especially on the influence of cytokinin IL-1 and IL-6 [2-3]. The mechanism of hepatic synthesis of CRP in the presence of stimulus increases protein concentrations above $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in about 6 hours and peak around 48 hours [2].

CRP refers very accurately to the infectious and/or inflammatory process in various diseases with or without tissue injury or in the presence of malignant neoplasia [4]. In vitro and in vivo studies have shown the complementary effect of CRP suggesting that, under various circumstances, CRP would act as a pro-inflammatory mediator and in the physiological and pathophysiological process itself, having important role against pathogens, such as bacteria, reinforcing the importance of host defense [1-4].

There is an association between circulating concentrations of CRP and the intensity, extent and progression of many diseases, making consistent that CRP plays a role not only as a disease marker but also as a participant in the pathogenesis of the disease. [1-4] For example formation of atheroma and deposition on the lipid plaque in atherosclerotic disease [4-7]. Therefore, the measurement of the CRP concentration contributes significantly to disease screening, monitoring of the response in inflammation treatment and combating complications of other pre-existing or developing diseases [1-4].

Detection of CRP in blood is performed by immunoassays, such as enzyme immunoassay (ELISA), radioimmunoassay, immunoturbidimetry, latex agglutination and nephelometry [8]. Despite these many options for CRP detection in the blood, the vast majority of techniques require adequate equipment and processing, skilled labor, and are relatively costly. In addition, current CRP detection methods are automated and require some time, which can often interfere with the patient's clinical picture [9]. Biosensors arise as skillful tools capable of enabling the analysis of bi-recognition events occurring on the surface of a transducer [10].

Immunosensors are a type of biosensor in which an antigen binds to the antibody and forms a stable complex in the transducer, making it possible to measure immunoaffinity [11]. In electrochemical biosensors, the transducer is an electrode and its principle is based on the consumption and/or generation of electroactive species during a

chemical and/or biological interaction, and in this process, the transducer measures the electrochemical signal produced by this interaction [12]. Various immunosensors are described in literature, due to the specificity of the antigen-antibody interaction and their sensitive and specific detection [13-14]. In addition, in some cases, there is an integration of the electrode with nanotechnological platforms, such as nanocomposites, increasing the sensor general performance [15].

Graphene is considered as an ideal transduction material for electrochemical biosensors due to the ability to increase surface area, conductivity and electrical transfer rate. In addition, when combined with conductive polymers, they also allow improvement in the immobilization and recognition of biomolecules [16], as well as sensitivity, specific, selectivity, stability and reproducibility of the electrode response [17].

In this work, a new electrochemical immunosensor was developed, based on graphite electrodes modified with a nanocomposite formed by reduced graphene oxide and polytyramine, to detect C-reactive protein in human serum.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials and Instrumentation

Tyramine hydrochloride (98%) was purchased from AcrosOrganics (Belgium). Potassium ferrocyanide (Vetec, Brazil), Potassium ferricyanide (Reagen, Brazil) and Perchloric acid (Merck, Germany) were from analytical grade and used as received from suppliers. Ultrapure deionized water (Gehaka, Brazil, resistivity 18 M Ω cm) was used in the preparation of all solutions. For the electrochemical analysis, all solutions were submitted to ultrapure N₂ bubbling (1 min mL⁻¹). Monoclonal anti-C-Reactive protein antibody produced in mouse (C1688), CRP specific antigen (C4063) and BSA - bovine serum albumin (A2153) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Stock solutions of biomolecules were prepared in phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4). Human serum samples were obtained from Sabin Medicina Diagnóstica Laboratory in Uberlândia, MG, Brazil, from patients with varied concentrations of CRP. Serum samples were used undiluted.

For voltammetric analysis, a potentiostat from CH Instruments model 760C (USA) was coupled with a three-electrode electrochemical cell, using graphite carbon (working), Ag/AgCl, KCl 3 mol L⁻¹ (auxiliary) and platinum plate (reference electrode). Cyclic voltammetry was performed at 50 mV/s on 0.12 mmol L⁻¹ solutions of electroactive species, prepared in 0.5 mol L⁻¹ perchloric acid. Unless otherwise indicated, the experiments were performed at room temperature (25 ± 1 °C).

2.2. Modification of graphite electrode with ERGO/polytyramine

Graphite electrodes (GE) were mechanically polished with aqueous suspension of alumina (0.3 µm), washed with deionized water, dried and preconditioned in HClO₄ 0.5 mol L⁻¹ solution by cyclic voltammetry between 0 V to +0.8 V, 4 cycles, 50 mV s⁻¹. After, 20 µL of the supernatant of a graphene oxide (GO) solution, prepared according to previous studies [18], were dripped onto the electrode, and incubated at 55 °C until drying. Electrochemical reduction of the GO was performed by cyclic voltammetry in sodium phosphate buffer solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4), between 0 V to -1.5 V, 10 cycles, 50 mV s⁻¹.

The electrodes modified with electrochemically reduced graphene oxide (ERGO) were subjected to cyclic voltammetry in tyramine solution (2.5 mmol L⁻¹), between 0 V to +1.1 V, 50mV.s⁻¹, 10 cycles. After modification of the electrodes with polytyramine (PTyr), the GE/ERGO/PTyr electrodes were subjected to cyclic voltammetry in order to remove the residual monomer in HClO₄ 0.5 mol L⁻¹ solution for 4 cycles, 50 mV s⁻¹, between 0 V to +1.1 V.

2.3. Immobilization of anti-CRP and detection of antigen in serum

Figure 1 shows the construction steps of the immunosensor. Onto the GE/ERGO/PTyr platform, 15 µL of anti-CRP solution (10 µg mL⁻¹) were dripped and maintained at 37 °C for 30 min for physical adsorption of the antibody onto the surface of the electrode. Then, the electrode surface was washed with 50 uL of phosphate buffer (0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) solution for three times. This washing step was conducted after each addition of biomolecule or serum. The surface was blocked with BSA (0.5% in phosphate

buffer solution) at 37 °C for 1 h. In order to evaluate the performance of the immunosensor, 10 uL of human serum with an initial concentration of 1.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was enriched with different concentrations of CRP (10, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and dripped onto the modified electrodes, incubated for 37 °C for 30 min and washed. After, differential pulse voltammetry was conducted using potassium ferro/ferricyanide redox pair (5 mmol L^{-1}) in KCl 0.1 mol L^{-1} , -0.1 to +0.5 V, 25 mV s^{-1} , 50 mV, 0.2 s. Human serum samples was originated from healthy individuals (HC1, HC2, HC3, HC4, and HC5) and patients with abnormal CRP concentration (P1, P2, P3, P4 and P5). Biosensor stability was evaluated after storage for 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 50 days, at 8 °C.

Regeneration capacity was also evaluated after the electrochemical detection, where the electrodes were rinsed with deionized water and washed 3 times with 50 uL of phosphate buffer solution (0.1 mol. L^{-1} , pH 7.4).

Measurements of the electrochemical impedance spectroscopy were performed in potassium ferrocyanide/ferricyanide solution (5 mmol L^{-1} containing KCl 0.1 mol L^{-1}), using an Autolab PGSTAT 302N potentiostat/galvanostat with a FRA2 module, 10 mV, 10 kHz to 0.1 Hz. Resistance to charge transfer (R_{ct}) was calculated using the resultants Nyquist Plots by the Electrochemical Circle Fit tool in the NOVA 2.1.3. software (Metrohm, Netherlands).

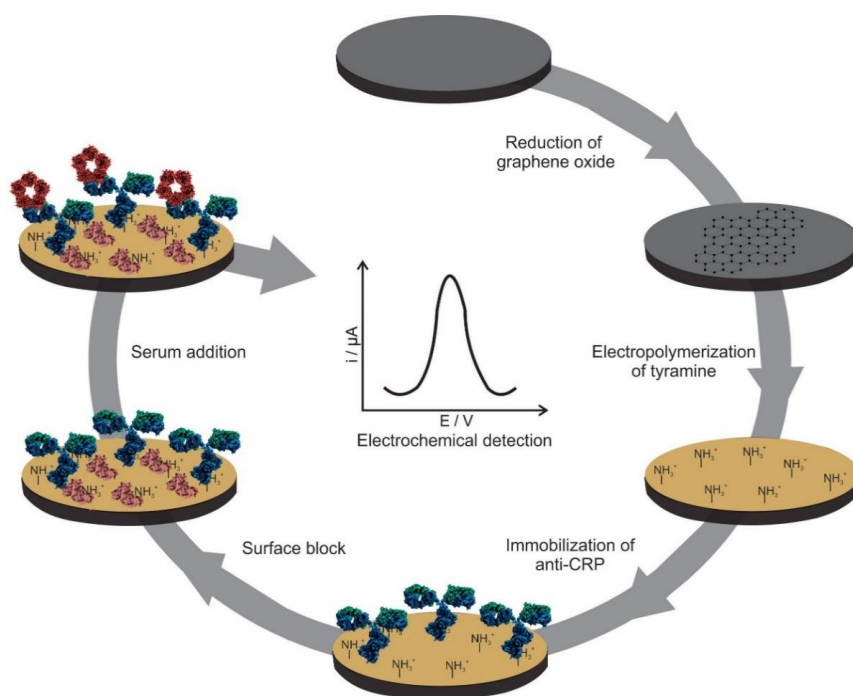


Figure 1. Schematic representation of the immunosensor.

2.4. Morphological analysis

Surface morphology was evaluated in absence or presence of biomolecules by atomic force microscopy (AFM), using a Shimadzu Scanning Probe Microscope – SPM 9600, non-contact mode, and the images were analyzed with Gwyddion 2.45 software.

Scanning electron microscopy (SEM) images were generated in a Zeiss microscope model EVO-MA10 in absence or presence of CRP target.

2.5. Statistical analysis

All the analyzes were realized in triplicate and the results were presented with arithmetic means \pm standard deviation. Voltammograms were plotted with Origin 8. Other graphs were performed using GraphPad Prism 6 (USA). The specificity, sensitivity and accuracy of the method was calculated according to Oliveira Filho, 2014 [19].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2A shows the response of the modification steps of the electrode surface using the ferro/ferricyanide redox pair. Bare GE (a) showed a current response amplitude of 0.839 mA. An increment of 27% in the current response (1.155 mA) was observed for the ERGO/PTyr (b). This increment is due to the presence of amino groups on the surface of the electrode, from tyramine [20], which are positively charged in neutral medium, attracting the negatively charged ferrocyanide ion. In addition, the nanocomposite increased the electroactive surface area of the electrode, favoring the electronic transference. When the anti-CRP is added (c), a decrease of 6% in the current (1.080 mA) was observed, due do the steric hindrance [9] and, after the surface blocking, another decrease of 15% (0.922 mA) was observed, due to the steric hindrance that the blocking causes on the surface, making difficult the contact of the ferrocyanide ion with the electrode surface. In addition, the isoelectric point of the BSA is 4.7 [21], which confers a negative charge net to this protein in a neutral medium, repelling the ferrocyanide ion, which also has negative charge.

Figure 2B and 2C shows the surfaces for the bare and modified electrodes in absence or presence of analite. GE presents an average roughness of 68.7 ± 5.3 nm. For the ERGO/PTyr nanocomposite, it is observed an increase in the roughness (110.9 ± 8.4 nm) and coverage of the graphite layer. Anti-CRP addition with and without blocking with BSA decreased the roughness values for 69.6 ± 4.3 nm and 54.5 ± 3.9 nm, respectively. BSA is a globular protein that fill the valleys on the electrode surface, causing decrease in the roughness value.

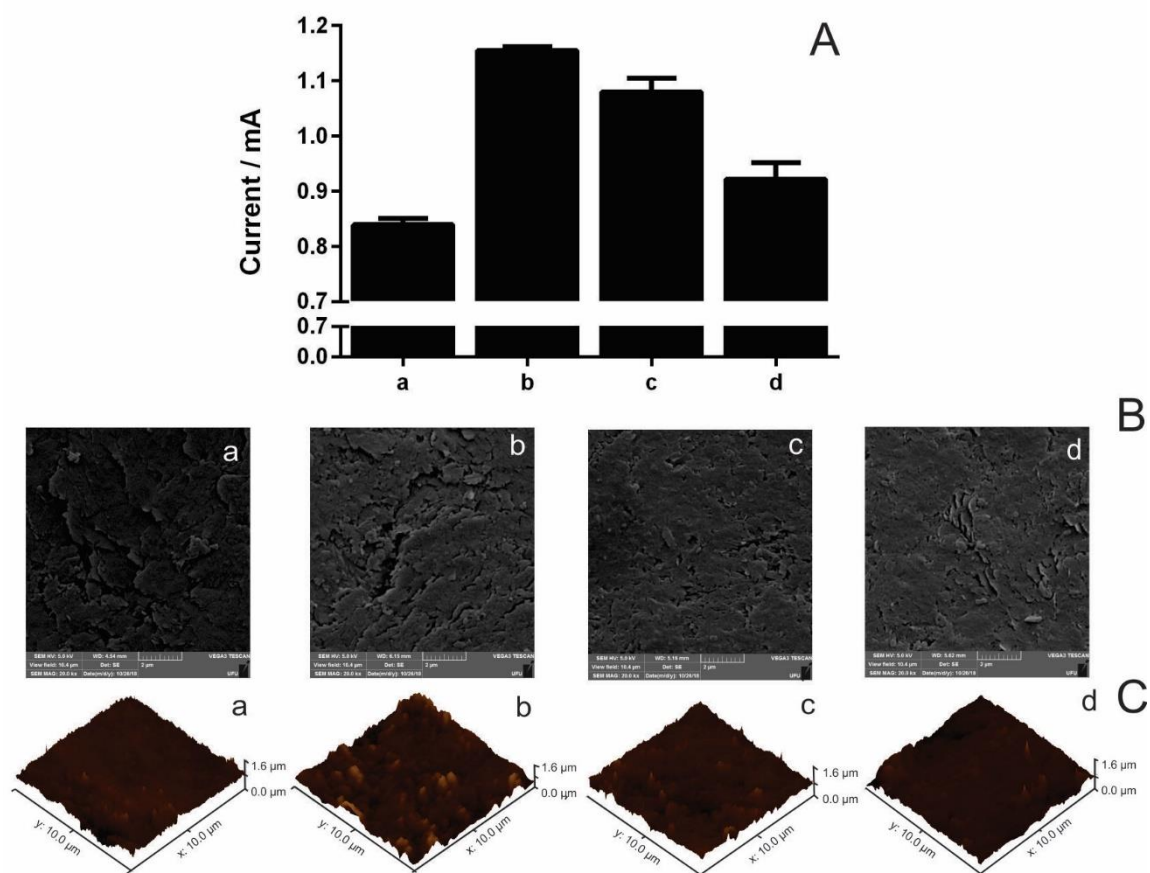


Figure 2. Histogram obtained from current peak response of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation (A), SEM (B) and AFM (C) images of the electrodes. (a) GE (b) GE/ERGO/PTyr (c) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP (d) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol L^{-1}) in 0.1 mol.L^{-1} KCl. Modulation amplitude: 50 mV . Pulse interval: 0.2 s ; Scan rate: 25 mV s^{-1} .

Figure 3A and 3B show the morphological analysis of the immunosensor using serum samples of healthy individual (a) and patients with abnormal CRP concentration (b). It is possible to observe differences in the morphology of both surfaces. SEM images show the formation of globular structures related to the immunocomplexes formed in presence of serum with high concentration of CRP, resulting in a roughness increase of 3.33 times,

when compared to the negative sample (60.3 ± 7.8 nm and 201.2 ± 18.9 nm for negative or positive samples, respectively). Morphological analyzes corroborated with the electrochemical impedance spectroscopy data (Fig 3C), showing an increase in the charge transfer resistance of 31% of the sample enriched with CRP in relation to the negative control, indicating that the immunocomplex was formed and that behaved as a diffusion barrier to the ferrocyanide ion on the surface of the electrode, increasing the resistance of the system (GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA/positive sample).

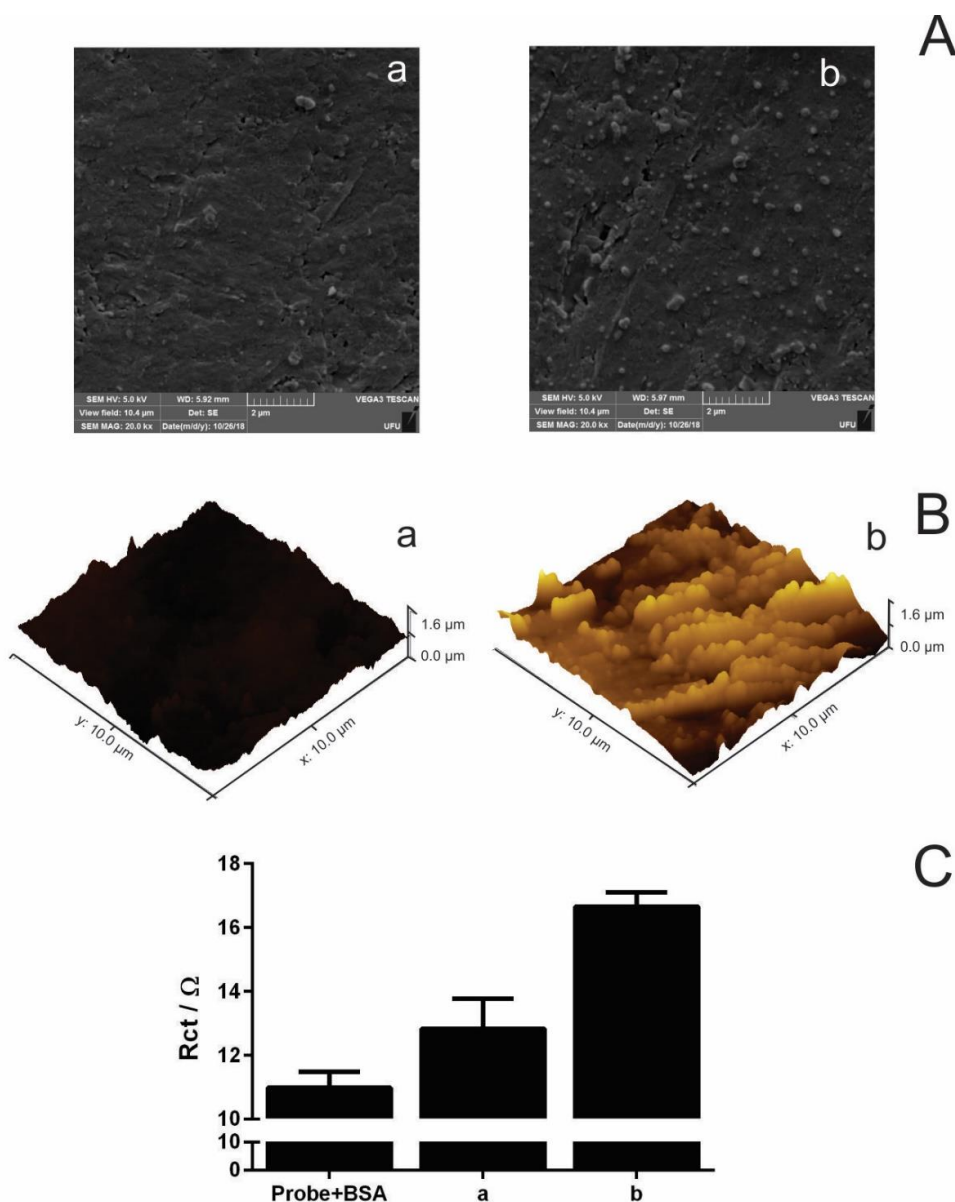


Figure 3. SEM (A) and AFM (B) images of the electrodes, histogram obtained from the resistance to charge transfer by EIS (C). (a) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA/negative sample and (b) GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA/positive sample. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L^{-1}) in KCl solution (0.1 mol.L^{-1}).

Figure 4A shows the differential pulse voltammograms for the GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA in the presence of serum samples enriched with different concentrations of CRP. With the increasing in CRP concentration, it is observed a proportional decrease in current. Since CRP is a large protein (~127 kDa), its adsorption on the surface of the immunosensor causes a steric hindrance, blocking access and making it difficult the electronic transfer for the redox pair. Still, CRP (pI 5.45) has a net negative charge in pH 7,4 [22], resulting in the repulsion of the ferrocyanide ions and decrease in electron transference, as observed in other studies [23, 24]. The immunosensor responded linearly to different concentrations of CRP, being possible to construct a calibration curve, represented in figure 4B, with equation $I \text{ (mA)} = 1.123 - 0.001789 \cdot [\text{CRP}] \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$, $r = 0,9949$. Calculated limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of CRP were $0.37 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These values are within of the minimum limits of circulating CRP in human serum ($1\text{-}5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

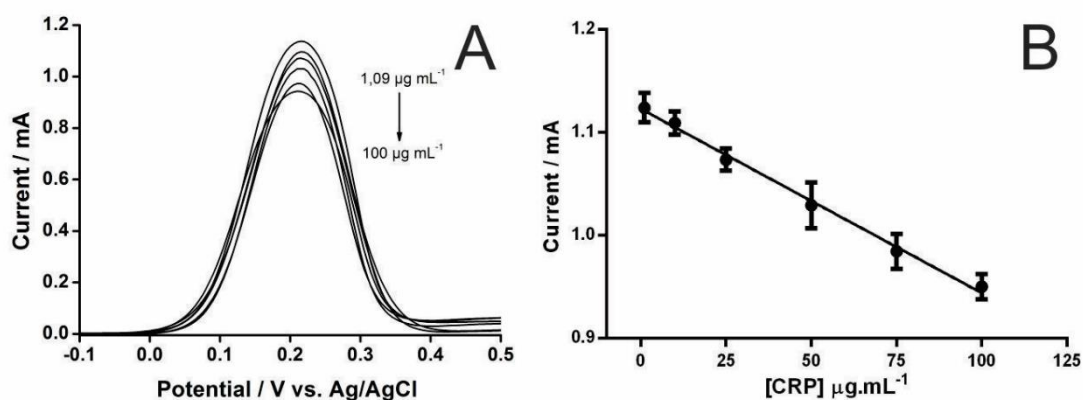


Figure 4. Differential pulse voltammograms (A) and calibration curve (B) obtained from current peak response of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation in GE/ERGO/PTyr /Anti-CRP/BSA incubated with different concentrations of CRP (1.09, 10, 25, 50, 75 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) in human serum. Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L^{-1}) in KCl solution (0.1 mol.L^{-1}). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s^{-1} .

Results of studies of storage stability and regeneration of CRP immunosensor was showed in Figure 5.

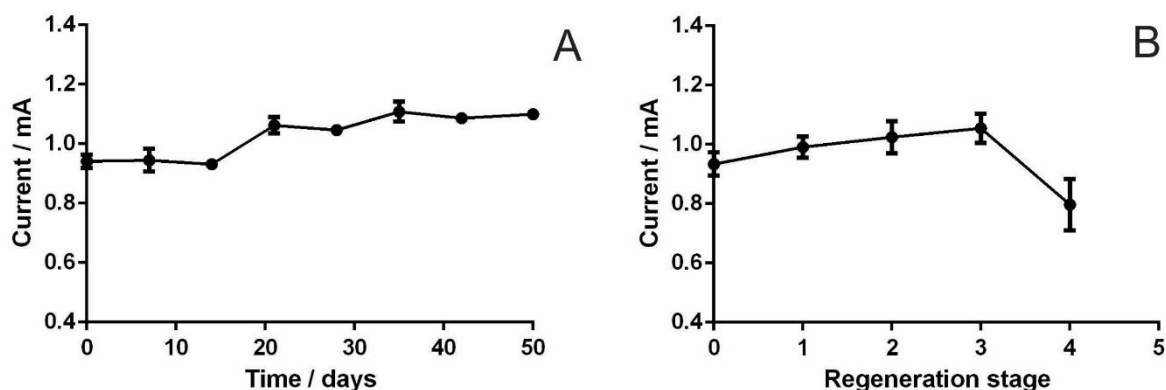


Figure 5. Storage stability profile of immunosensor at 10°C during 50 days (A) and regeneration stage (B). Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L⁻¹) in KCl solution (0.1 mol.L⁻¹). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s⁻¹.

Figure 5A shows the stability of the bioelectrode over 50 days. In the first 14 days, the biosensor response was maintained. However, in the fiftieth day it lost 85%, in comparison with the control. The regeneration of the biosensor was tested to reduce costs and favor the commercialization process [25]. Until fourth analyses (after three washes), the immunosensor was regenerated with success (Fig 5B). Comparison of analytical performance with some other immunosensors for detection of CRP is showed in Table 1.

Table 1. Analytical parameters of different electrochemical immunosensors recently described for CRP detection in serum sample.

Platform	Linearity range	Limits of detection	Limits of quantification	Stability	Serum dilution factor	Reference
Gold screen printed electrode	6.25-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.59 $\mu\text{g mL}^{-1}$	N.A	N.A	[22]
Graphite electrode/ poly-3 aminothiophenol	0.075-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$	7.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$	N.A	N.A	N.A	[26]
Glassy carbon electrode/ AuNps	0.005-125 ng mL ⁻¹	0.0017 ng mL ⁻¹	N.A	N.A	500	[27]
Carbon Screen Printed electrode/AuNps	0.047-23.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$	17 ng mL ⁻¹	N.A	28 days	20	[28]

ITO-PET electrodes/ polyamidoamine/11- cyanoundecyltrimethoxysi lane	21-6148 fg mL ⁻¹	0.34 fg mL ⁻¹	1.13 fg mL ⁻¹	42 days	10 ⁶	[29]
ITO electrodes/reduced graphene oxide nanoparticules	1-1000 ng mL ⁻¹	0.08 ng mL ⁻¹	N.A	N.A	200	[30]
Carbon Screen Printed Electrode/bismuth citrate	0.2-100 ng mL ⁻¹	0.05 ng mL ⁻¹	N.A	N.A	500	[31]
Dual screen-printed working paper electrode/phosphocholine	0.005-500 µg mL ⁻¹	0.001 µg mL ⁻¹	N.A	4 days	no dilution	[32]
Graphite/reduced graphene oxide/polytyramine	1.09-100 µg mL ⁻¹	0.37 µg mL ⁻¹	1.25 µg mL ⁻¹	50 days	no dilution	This work

(N.A. not available)

It is relevant to emphasize that CRP levels below 1 µg mL⁻¹ in the human serum do not represent risk of heart disease, inflammation or other pathological condition [2, 4, 33]. Thus, the present immunosensor has advantages over those already reported in the literature, such as an inexpensive platform, linear range, stability and serum dilution. This last factor is important, since this biosensor can be used soon after sample collection, without the need for further manipulation, once its selectivity has been demonstrated against possible interfering substances present in the human serum. Moreover, it showed 100% sensitivity, specificity and accuracy from the results of samples with different concentrations of CRP.

Figure 6 shows the data of the analyzes using serum of patients with different concentrations of CRP. It is possible differentiate human serum samples from healthy individuals and patients with abnormal CRP concentration. Validation of the CRP immunosensor using patient samples is showed in Table 2.

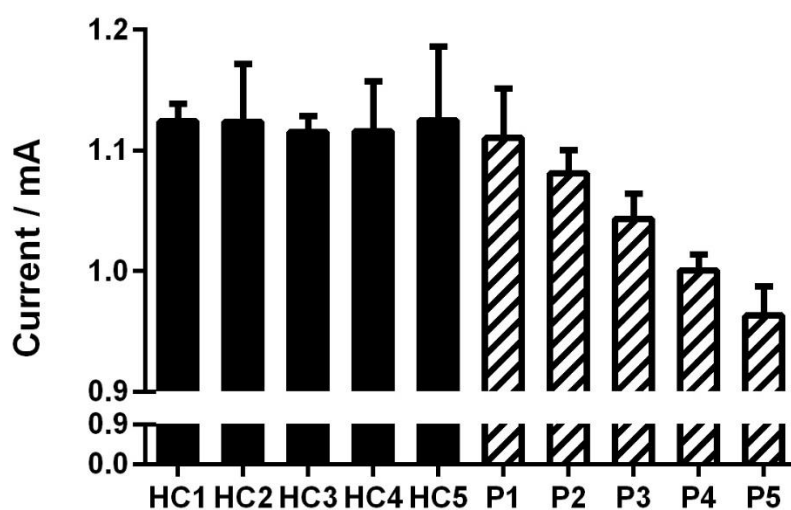


Figure 6. Histogram obtained from current peak response of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation in GE/ERGO/PTyr/Anti-CRP/BSA incubated with samples from different patients with altered CRP values (1–5) and healthy controls (HC1–HC5). Electrolyte: potassium ferrocyanide/ferricyanide (5 mmol.L^{-1}) in KCl solution (0.1 mol.L^{-1}). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate: 25 mV s^{-1} .

Table 2. Mean results of the measurements of serum samples from patients with altered CRP using both the proposed immunosensor and the immunoturbidimetric assay. Errors represents the standard deviation.

Clinical Sample	[CRP] Immunoturbidimetric Assay ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[CRP] Biosensor (Mean \pm SD $\mu\text{g mL}^{-1}$)
HC1	1.09	$<1.0 \pm 3.57$
HC2	< 1.0	$<1.0 \pm 3.69$
HC3	1.47	4.33 ± 3.84
HC4	2.05	3.95 ± 3.85
HC5	2.69	$<1.0 \pm 3.14$
P1	11	7.17 ± 3.96
P2	22.07	23.69 ± 2.55
P3	35.96	45.07 ± 0.74
P4	73.55	69.17 ± 1.30
P5*	185.97	180.66 ± 6.19

* Patient 5 (P5) serum was diluted in 1:1 with phosphate buffer, due to high concentration of CRP, since it was not at the linear range ($1.09 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4. Conclusion

Considering the importance of measuring the concentration of CRP in numerous clinical trials, the construction of cheaper and easy-to-use, but still sensitive and selective devices, is extremely valuable. The proposed biosensor was built on a low cost carbon and polymer platform, able of miniaturization and mass production. The developed immunosensor coupled with the easy handling and short response time (32 minutes) allows its use in screening analyzes, in which a large number of analyzes and a short time interval are required. This immunosensor is sensitive, with a detection limit of $0.37 \mu\text{g mL}^{-1}$, presenting good stability, capacity of regeneration and differentiating human serum samples from healthy individuals and patients with abnormal CRP concentration. All these characteristics make the biosensor proposed in this work a valuable contribution to the point-of-care quantification of C-reactive protein.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-014/2010), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Master's Degree scholarship for S. H. D. Ribeiro.

References

- [1] M.B. Pepys, M.L. Baltz, Acute Phase Proteins with Special Reference to C-Reactive Protein and Related Proteins (Pentaxins) and Serum Amyloid A Protein, in: *Advances in Immunology*, Elsevier, 1983: pp. 141–212. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60379-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60379-X)
- [2] D.M. Vigushin, M.B. Pepys, P.N. Hawkins, Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease., *J Clin Invest.* 91 (1993) 1351–1357. <https://doi.org/10.1172/JCI116336>

- [3] T.W. Du Clos, C. Mold, C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity, *Immunol Res.* 30 (2004) 261–278. <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:261>
- [4] M.B. Pepys, G.M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update, *J Clin Invest.* 111 (2003) 1805–1812. <https://doi.org/10.1172/JCI200318921>
- [5] M. Di Napoli, M. Schwaninger, R. Cappelli, E. Ceccarelli, G. Di Gianfilippo, C. Donati, H.C.A. Emsley, S. Forconi, S.J. Hopkins, L. Masotti, K.W. Muir, A. Paciucci, F. Papa, S. Roncacci, D. Sander, K. Sander, C.J. Smith, A. Stefanini, D. Weber, Evaluation of C-Reactive Protein Measurement for Assessing the Risk and Prognosis in Ischemic Stroke: A Statement for Health Care Professionals From the CRP Pooling Project Members, *Stroke.* 36 (2005) 1316–1329. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000165929.78756.ed>
- [6] H.-K. Kuo, C.-J. Yen, C.-H. Chang, C.-K. Kuo, J.-H. Chen, F. Sorond, Relation of C-reactive protein to stroke, cognitive disorders, and depression in the general population: systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol.* 4 (2005) 371–380. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70099-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70099-5)
- [7] I. Ramasamy, Biochemical markers in acute coronary syndrome, *Clin Chim Acta.* 412 (2011) 1279–1296. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.003>
- [8] M. Algarra, D. Gomes, J.C.G. Esteves da Silva, Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood, *Clin Chim Acta.* 415 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.007>
- [9] H. Hennessey, N. Afara, S. Omanovic, A.L. Padjen, Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface, *Anal Chim Acta.* 643 (2009) 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.009>
- [10] P. Mehrotra, Biosensors and their applications – A review, *J Oral Biol Craniofac Res.* 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>

- [11] J. Zhang,.; J. zhao, Chapter 5 - Immuno-Biosensor. In: G. Li, Nano-inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications, Elsevier, 2018. p.115-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815053-5.00005-2>
- [12] M. Mehrvar, M. Abdi, Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Anal Sci.* 20 (2004) 1113–1126. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>
- [13] D.W. Kimmel, G. LeBlanc, M.E. Meschievitz, D.E. Cliffel, Electrochemical Sensors and Biosensors, *Anal Chem.* 84 (2012) 685–707. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>
- [14] N.K. Bakirhan, G. Ozcelikay, S.A. Ozkan, Recent progress on the sensitive detection of cardiovascular disease markers by electrochemical-based biosensors, *J Pharm Biomed Anal.* 159 (2018) 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.021>
- [15] P. D’Orazio, Biosensors in clinical chemistry — 2011 update, *Clin Chim Acta.* 412 (2011) 1749–1761. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.025>
- [16] M. Rahman, X.-B. Li, N. Lopa, S. Ahn, J.-J. Lee, Electrochemical DNA Hybridization Sensors Based on Conducting Polymers, *Sensors.* 15 (2015) 3801–3829. <https://doi.org/10.3390/s150203801>
- [17] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 33 (2013) 1853–1859. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.035>
- [18] J.V. da Silva, A.G.B. Madurro, J.M. Madurro, Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization, *J Solid State Electrochem.* 21 (2017) 2129–2139. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>
- [19] P.F. de O. Filho, *Epidemiologia e Bioestatística – Fundamentos para a Leitura Crítica*, Editora Rubio, 2015.
- [20] C.M. de Castro, S.N. Vieira, R.A. Gonçalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes

modified with polytyramine, *J Mater Sc.* 43 (2008) 475–482.
<https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

[21] L.-C. Sang, A. Vinu, M.-O. Coppens, General Description of the Adsorption of Proteins at Their Iso-electric Point in Nanoporous Materials, *Langmuir*. 27 (2011) 13828–13837. <https://doi.org/10.1021/la202907f>

[22] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server, in: *2-D Proteome Analysis Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1998: pp. 531–552.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>

[23] L.O. Resende, A.C.H. de Castro, A.O. Andrade, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Immunosensor for electro detection of the C-reactive protein in serum, *J Solid State Electrochem.* 22 (2018) 1365–1372. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3820-z>

[24] V.R. Rodovalho, G.R. Araujo, E.R. Vaz, C. Ueira-Vieira, L.R. Goulart, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Peptide-based electrochemical biosensor for juvenile idiopathic arthritis detection, *Biosens Bioelectron.* 100 (2018) 577–582.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.012>

[25] J.A. Goode, J.V.H. Rushworth, P.A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes, *Langmuir*. 31 (2015) 6267–6276.
<https://doi.org/10.1021/la503533g>

[26] A.J.G. Lemos, R.P.A. Balvedi, V.R. Rodovalho, L.O. Resende, A.C.H. Castro, S. Cuadros-Orellana, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein, *Microchem J.* 133 (2017) 572–576. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.026>

[27] J. Wang, J. Guo, J. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, RNA aptamer-based electrochemical aptasensor for C-reactive protein detection using functionalized silica microspheres as immunoprobes, *Biosens Bioelectron.* 95 (2017) 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.014>

- [28] Madasamy Thangamuthu, Christian Santschi, Olivier J. F. Martin, Label-Free Electrochemical Immunoassay for C-Reactive Protein, *Biosensors*. 8 (2018) 34. <https://doi.org/10.3390/bios8020034>
- [29] M.N. Sonuç Karaboğa, M.K. Sezgintürk, Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: A new immunosensor design from an old molecule, *Talanta*. 186 (2018) 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.051>
- [30] A.K. Yagati, J.-C. Pyun, J. Min, S. Cho, Label-free and direct detection of C-reactive protein using reduced graphene oxide-nanoparticle hybrid impedimetric sensor, *Bioelectrochemistry*. 107 (2016) 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.10.002>
- [31] C. Kokkinos, M. Prodromidis, A. Economou, P. Petrou, S. Kakabakos, Disposable integrated bismuth citrate-modified screen-printed immunosensor for ultrasensitive quantum dot-based electrochemical assay of C-reactive protein in human serum, *Anal Chim Acta*. 886 (2015) 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.035>
- [32] Y. Boonyasit, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, A folding affinity paper-based electrochemical impedance device for cardiovascular risk assessment, *Biosens Bioelectron*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.031>
- [33] P.M. Ridker, C-Reactive Protein: A Simple Test to Help Predict Risk of Heart Attack and Stroke, *Circulation*. 108 (2003). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093381.57779.67>

