



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA  
DETECÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA  
HUMANO (TNF- $\alpha$ )**

**LUANA KELLY LIMA SANTANA**

**MANAUS – AM  
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA  
DETECÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA  
HUMANO (TNF- $\alpha$ )**

Dissertação apresentado ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestre.

**Orientador: Professora Doutora MARIA CRISTINA DOS SANTOS (ICB – UFAM)**

**Coorientadora: Professora Doutora MICHELLA LIMA LASMAR (ESA - UEA)**

**MANAUS – AM  
2016**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S232d SANTANA, LUANA KELLY LIMA  
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO  
DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA HUMANO (TNF- ) /  
LUANA KELLY LIMA SANTANA. 2016  
54 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: MARIA CRISTINA DOS SANTOS  
Coorientadora: MICHELLA LIMA LASMAR  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. BIOSSENSOR. 2. ANTICORPO. 3. CITOCINA. 4. DOENÇAS  
AUTOIMUNES. 5. IMUNOSSENSOR. I. SANTOS, MARIA  
CRISTINA DOS II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA DETECÇÃO DE FATOR DE  
NECROSE TUMORAL ALFA HUMANO (TNF-  $\alpha$ )**

Dissertação apresentado ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestre.

Aprovada em 20 de outubro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof(a) Doutora Maria Cristina dos Santos  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof(a) Doutora Ellen Regina da Costa Paes  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof(a) Doutora Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro  
Universidade do Estado do Amazonas

Os Dias Prósperos não vêm por acaso, mas nascem de muito trabalho e persistência (Henry Ford)

Quando tudo parecer estar contra você lembre-se de que o avião decola contra o vento, não a favor dele (Henry Ford)

Na escada da vida cada degrau é uma conquista, cada escorregão é uma lição (autor desconhecido)

Dedico este trabalho à minha Família. Aos Meus Pais pela educação e oportunidades proporcionados, ao meu Esposo por todo apoio e incentivo durante trajetória acadêmica e profissional, por me ajudar nos afazeres diversos e principalmente por estar ao lado dos nossos Filhos nas horas em que estive ausente para desenvolver este trabalho. Aos meus Filhos agradeço a compreensão e paciência por vezes me esperando ao término de experimentos duradouros. Dedico ainda a minha orientadora por me dar força, acreditar no trabalho e apoiar cada passo do trabalho. Dedico aos coorientadores que se dispuseram dar todo suporte para o trabalho e todos amigos envolvidos nas etapas desse.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos recebidas em minha vida e oportunidade de estar contribuindo com a saúde da população e com a ciência do estado do Amazonas.

À minha família, em especial ao meu Esposo que esteve sempre apoiando e incentivando o meu aprimoramento profissional e principalmente por sempre me ajudar com afazeres e acompanhar nossos Filhos nos momentos em que precisei estar ausente.

À minha Orientadora Profa. Doutora Maria Cristina dos Santos que aceitou o desafio de me orientar quando pensava em desistir de fazer um mestrado. Por todo carinho, paciência, força e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus Coorientadores Profa Doutora Michella Lima Lasmar e Prof Doutor Ricardo Lima Serudo pelo suporte técnico e infraestrutura disponibilizados, pelo apoio e carinho. Ao Colega e Companheiro de Projeto Philipi Cavalcante Ricardo por toda atenção e empenho nas execuções dos experimentos e suporte técnico dispensado.

Aos Coordenador e Vice-Coordenador do PPGBIOTEC Prof Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva e Prof Doutor Edmar Vaz de Andrade pelo apoio financeiro para compra de insumos e reagentes necessários a realização de experimentos deste trabalho.

Às amigas e companheiras do Laboratório de Imunoquímica pelo apoio e ajuda durante esse tempo de convívio, Ilia Gilmara Carvalho dos Santos, Valéria Mourão, Juliana Lameiras e Maria Carolina Scheffer de Souza.

À Diretora do Centro de Atenção Psicossocial Infanto Juvenil Leste da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus, Elivandra Franco Mendes, pelo incentivo e liberação das atividades profissionais para cursar disciplinas e realização de experimentos do mestrado.

À Diretora do Departamento de Logística e ex-Gerente da Assistência Farmacêutica da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus, Farmacêutica Maria Vanda Viana por ter aceitado pedido de afastamento de atividades profissionais para cursar disciplinas do mestrado ainda em período probatório, pelo incentivo e apoio. Á atual Gerente Farmacêutica Mie Muroya Guimarães pelo apoio e incentivo ao aprimoramento profissional.

À amiga e companheira de PET e Graduação, Doutoranda do PPGIBA-UFAM/HEMOAM e Farmacêutica Bioquímica da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus Nadja Pinto Garcia pelo apoio e incentivo no decorrer deste trabalho.

A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente no desenvolver desse trabalho e ainda àqueles que incentivaram, apoiaram e contribuíram para realização do nosso trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>13</b>
3.1 Parte 1 .....	13
3.2 Parte 2 .....	13
<b>PARTE 1 – ARTIGO DE REVISÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>PARTE 2 – ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>27</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como na artrite reumatóide, o TNF- $\alpha$  pode encontrar-se de forma desregulada em outras doenças como o cancro (câncer), lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença inflamatória do intestino (doença de Crohn, Colite ulcerativa), psoríase, doenças pulmonares (Fibrose cística (FC), Asma), espondilite anquilosante, transplante (doença do enxerto contra hospedeiro, rejeição do aloenxerto), aterosclerose, calcificação arterial, doenças neurodegenerativas (Esclerose múltipla (EM), doença de Alzheimer, doença de Prion, doença de Parkinson) (IBL, 2012).

A ligação do TNF- $\alpha$  com doenças autoimunes está bem estabelecida e a incidência destas enfermidades tem aumentado gradativamente nos últimos anos, com um valor estimado de prevalência acima de 2% da população geral. Somente a AR já tem uma prevalência estimada entre 0,5 - 1% da população mundial, variando conforme o grupo populacional estudado. Um dos tratamentos-chave dessas doenças é a neutralização ou bloqueio de citocinas, presentes nestes processos inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ . (CASTRO-LÓPEZ et al., 2014; TOBÓN et al., 2010).

Os agentes biológicos usados e difundidos para o tratamento de doenças autoimunes são frutos de pesquisas e descobertas em Biotecnologia, que permitiram o desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos, dentre quais se destacam os que neutralizam ou atuam como receptor para fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), denominados anti-TNF- $\alpha$ . Estes imunobiológicos apresentam vantagem sobre outros medicamentos, como os DMARDs clássicos por sua especificidade contra alvos terapêuticos definidos e com papel conhecido no tratamento de algumas doenças (MACHOLD et al., 2006; SOCIEDAD CHILENA DE REUMATOLOGIA, 2008; MORENO et al., 2006; CRUVINEL et al., 2008; CARVALHO JUNIOR et al., 2009).

A neutralização ou o bloqueio da ação do TNF- $\alpha$  pode melhorar o prognóstico de inúmeras doenças, como as já mencionadas, com relevante importância clínica, uma vez que sua detecção no plasma sanguíneo pode ajudar no diagnóstico da doença e na inspeção do progresso da patologia (KONGSUPHOL et al., 2014).

Vários neutralizadores ou bloqueadores de TNF- $\alpha$  foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos. No Brasil, estão disponíveis o Remicade<sup>®</sup> (infleximabe), o Enbrel<sup>®</sup> (etanercepte), o Humira<sup>®</sup> (adalimumabe), o Simponi<sup>®</sup> (Golimumbe) e o Cimzia<sup>®</sup> (Certolizumabe) que ainda não possuem relatos de superioridade terapêutica em relação à outros antiinflamatórios comuns. Entretanto, o acesso à terapia limitado, a ocorrência

de efeitos adversos, alto custo do tratamento, aplicação em nível hospitalar, variável eficácia do tratamento entre os pacientes e a perda da resposta de drogas pela evolução da doença, obriga o monitoramento de TNF- $\alpha$ , em pacientes usando soro ou plasma para avaliar tanto a eficácia do tratamento como o prognóstico da doença (CASTRO-LÓPEZ et al., 2014; ANVISA, 2013; FALEIRO et al., 2011; CENTOCOR, 2010).

Apesar de eficientes os imunobiológicos, utilizados na terapia anti-TNF, podem desencadear efeitos indesejáveis como o surgimento de síndromes semelhantes ao lúpus induzido por fármacos, que para seus sintomas remitirem precisa ter o uso suspenso, assim que identificada a suspeita dessa síndrome (FURST et al., 2005). Essa terapêutica também pode induzir a formação de anticorpos antinucleares (ANA), evento frequente em doentes sob terapêutica com infliximab, embora sem significado clínico ainda elucidado. (BRAUN; SIEPER, 2004).

O TNF- $\alpha$  por ser uma citocina importante no controle de doenças infecciosas, a terapia anti-TNF tem se tornado uma preocupação no tocante de existir poucas informações e pelo surgimento de infecções oportunistas durante o seu uso, como a Tuberculose Latente, e o aparecimento de infecções granulomatosas, como a listeriose, coccidiomicose ou histoplasmose (FALEIRO et al., 2011; CRAVO et al., 2006).

A quantificação de TNF- $\alpha$  em soro humano tanto em rotina laboratorial médica quanto de pesquisa é realizada pelos testes imunoenzimáticos de absorvância (ELISA), considerados ainda o padrão ouro (SHRIVASTAVA et al., 2014). Existem inúmeros “kits” comerciais disponíveis no mercado com alta sensibilidade e eficiência. Entretanto, esta técnica apresenta altos custos, com necessidade de laboratório equipado e recursos humanos bem treinados para execução, além de múltiplas etapas para realização e tempo mínimo de quatro horas para obtenção do resultado final.

Com o intuito de simplificar os processos de detecção, encurtar o tempo de análise, melhorar a sensibilidade e reduzir custos, os biossensores de quantificação de TNF- $\alpha$  estão sendo desenvolvidos. (KONGSUPHOL et al., 2014).

Os biossensores são sistemas analíticos que fazem uso de materiais biológicos tais como tecidos, microrganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, dentre outros, derivados biológicos como anticorpos e proteínas recombinantes, etc., ou biológicos sintéticos, em superfícies de transdutores físico-químicos ou microsistemas integrados, ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou micromecânicos (LAZCKA et al., 2007; LIMA, 2008).

O elemento principal de um biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas que proporcionam seletividade ao sistema. O uso de material biológico, bem como a escolha do transdutor, dependem fundamentalmente do tipo de amostra a ser analisada e do tipo de medida a qual se almeja. Sendo assim, a parte biológica do processo determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor, sendo este reconhecimento seletivo o principal objetivo no desenvolvimento desta tecnologia (MELO, 2008).

Os métodos electroquímicos, executados por biossensores são atualmente um foco de investigação, apesar das dificuldades referentes à reprodutibilidade desses métodos e a estabilidade de enzimas e outros agentes. Por isso, podem ser encontrados na literatura muitos estudos sobre o desenvolvimento de novos materiais transdutores, assim como técnicas de imobilização (GIL; MELO, 2010).

Pelo exposto, o presente estudo teve por finalidade desenvolver um imunossensor para quantificação de TNF- $\alpha$  circulante utilizando a espectroscopia de impedância electroquímica (EIS).

O trabalho desenvolvido está exposto em duas partes, em formato de artigos científicos que serão submetidos a revistas distintas e que, se dividem em: Parte 1 – Artigo de Revisão Sobre Imunossensores Electroquímicos e suas aplicações e Parte 2 – Artigo Científico Sobre Imunossensor de Pasta de Carbono para detecção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), por meio de Espectroscopia de Impedância Electroquímica (EIS).

Esse imunossensor desenvolvido servirá de base para futuros testes clínicos de monitoramento, em tempo real, do TNF- $\alpha$  liberado (no sangue, ou no plasma, ou na saliva), para o diagnóstico e a seleção de conduta terapêutica administrada em pacientes portadores de doenças autoimunes ou de outras patologias inflamatórias crônicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver um imunossensor para detecção de TNF- $\alpha$  circulante, baseado na interação antígeno-anticorpo pelo método de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Testar técnica de modificação do eletrodo;
- b) Investigar metodologia de construção de monocamada automontada para imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo;
- c) Testar técnica de imobilização de anticorpos sobre eletrodo;
- d) Identificar as interações bioquímicas e eletroquímicas do TNF- $\alpha$ ;
- e) Construir curva analítica de resposta do biossensor proposto para avaliar a linearidade de resposta.

### **3. METODOLOGIA**

O desenvolvimento e resultados do Estudo para desenvolver Imunossensor para detecção de TNF- $\alpha$  por espectroscopia de impedância eletroquímica serão apresentados em duas Partes.

#### **3.1 Parte 1**

Artigo de Revisão Bibliográfica Intitulado “Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações”, que após defesa de Dissertação e aprovação pela Banca Examinadora foi submetido e aceito para publicação na Revista Científica Scientia Amazônia.

#### **3.2 Parte 2**

Artigo Científico com metodologia desenvolvida, resultados e discussão sobre o trabalho desenvolvido. Intitulado “Imunossensor de Pasta de Carbono para detecção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)”, que após defesa de Dissertação e aprovação pela Banca Examinadora será submetido à Revista Científica Biosensors and Bioelectronics.

## **PARTE 1 – ARTIGO DE REVISÃO**

# IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS E SUAS APLICAÇÕES<sup>1</sup>

Luana Kelly Lima Santana<sup>2</sup>, Philipi Cavalcante Ricardo<sup>3</sup> Ricardo Lima Serudo<sup>4</sup>,  
Michella Lima Lasmar<sup>5</sup> e Maria Cristina dos Santos<sup>6</sup>

Recebido em: / /2016, revisado: / /2016, aceito em: / /2016.

## Resumo

Imunossensor é um sistema baseado na interação imune de reconhecimento antígeno-anticorpo, que envolve imobilização de antígenos ou anticorpos sobre a superfície transdutora, com consequente emissão de sinais durante essa interação de reconhecimento molecular. Os tipos de transdutores disponíveis são os físico-químicos ou microsistemas integrados, ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou micromecânicos. Diversos imunossensores estão sendo desenvolvidos para simplificar os processos de detecção, diminuir o tempo de análise, melhorar a sensibilidade e reduzir custos. Dentre as técnicas de detecção a eletroquímica gera dados de elevada qualidade e é indicada para detecção de citocinas, proteínas, enzimas e outras substâncias. A pesquisa bibliográfica que subsidiou essa revisão foi baseada em trabalhos publicados nos últimos 20 anos (1996 a 2016), obtidos nas Bases de dados Científicos como *ScienceDirect*, *Periódicos Capes*, *Scopus* e *Lilacs* e, ao final foram selecionados 2.332 artigos, que utilizaram a técnica eletroquímica. Dentre as vantagens dessa técnica têm-se a diversidade de opções que estão disponíveis para o público em termos de eletrodos, instrumentos, marcadores enzimáticos e reagentes. Além de apresentarem pequeno nível de interferências eletroquímicas em amostras clínicas ou alimentares complexas, redução ou eliminação de etapas de lavagem ou adição de reagentes externos acoplados com o baixo custo e a facilidade de uso de instrumentação para o diagnóstico rápido, prevenção e tratamento de muitas doenças, incluindo doenças infecciosas e autoimunes.

**Palavras-Chave:** transdutor, doenças autoimunes, citocinas, anticorpos, biossensor.

## Abstract

Immunosensor is an immune system based on the interaction of antigen-antibody recognition, which involves immobilizing antigens or antibodies on the transducer surface, with consequent emission of signals during this molecular recognition interaction. The types of transducers are available physicochemical or integrated microsystems, optical, electrochemical, thermometric, piezoelectric, magnetic or micromechanical. Several immunosensors are being developed to simplify the detection process, reduce the analysis time, improve the sensitivity and reduce costs. Among the detection techniques electrochemical generates high quality data and is suitable for detection of cytokines, proteins, enzymes and other substances. The literature that supported the review was based on papers published in the last 20 years (1996-2016), obtained from Scientific databases like *ScienceDirect*, *Capes*, *Scopus*, and *Lilacs* and at the end we selected 2,332 articles, which used the technique electrochemistry. Among the advantages of this technique are the diversity of options that are available to the public in terms of electrodes, instruments, reagents and enzyme markers. In addition to having low electrochemical interferences in complex clinical or food sample, reduction or elimination of washing steps or the addition of external reagents coupled with the low cost and ease of instrumentation used for fast diagnosis, prevention and treatment of many diseases including infectious and autoimmune diseases.

**Key-words:** transducer, autoimmune diseases, cytokines, antibodies, biosensor.

---

<sup>1</sup> Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>2</sup> Farmacêutica da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus e Professora Assistente da Universidade Paulista – UNIP. Avenida Adolfo Ducke, 1221 – Conjunto Acariquara – Coroado III, Manaus, AM. CEP 69082-653. E-mail: luana.lima.santana@gmail.com.

<sup>3</sup> Aluno de Iniciação Científica da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto de Química da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

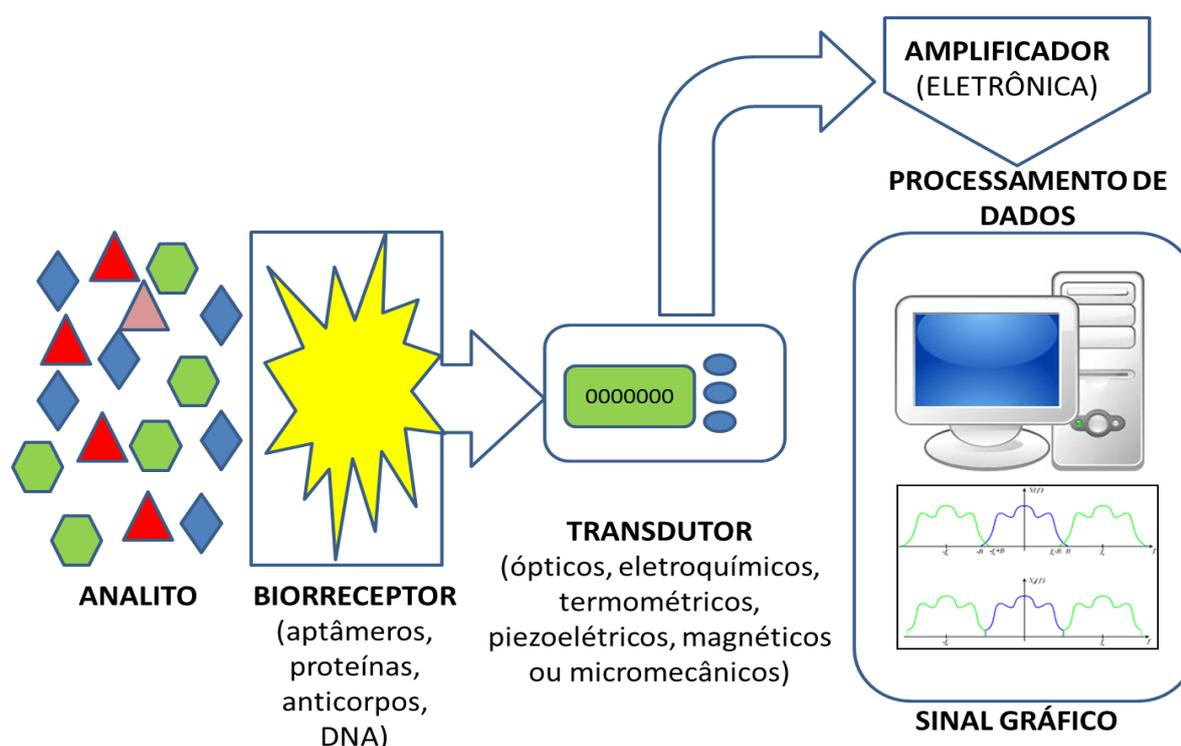
<sup>5</sup> Professora Adjunta de Patologia Geral da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus, AM, Brasil.

<sup>6</sup> Professora Associada do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

## 1. Introdução

Biossensores são sistemas analíticos constituídos de *materiais biológicos* como tecidos, microrganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, dentre outros; ou *derivados biológicos* como anticorpos recombinantes, proteínas recombinantes, etc.; ou

*biológicos sintéticos*, que são acoplados a superfícies de transdutores físico-químicos ou microssistemas integrados, ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou micromecânicos (LAZCKA et al., 2007). Figura 1.



**Figura 1:** Esquema representativo de Biossensores. Baseado em: MARTINS, et al., 2013.

A camada sensora, constituída por *material biológico*, *derivados biológicos* ou *biológicos sintéticos*, os quais proporcionam seletividade ao sistema, é o elemento principal de um biossensor. O material biológico e o transdutor, dependem fundamentalmente do tipo de amostra a ser analisada e o tipo de parâmetro a ser medido. A porção biológica do processo é a responsável pela seletividade ou especificidade do biossensor, principal objetivo no desenvolvimento desta tecnologia (LAZCKA et al., 2007).

Diversos componentes biológicos podem ser utilizados no desenvolvimento de biossensores e podem ser baseados na ligação antígeno-

anticorpo, hibridização de ácidos nucleicos, aptâmeros, enzimas e biorreceptores. Os biossensores auxiliam no diagnóstico de doenças e no monitoramento médico pela da detecção de agentes infecciosos, de anticorpos e de biomarcadores, etc. (CALIL; SILVA, 2014; CHUNG et al., 2006; GIL et al., 1999; GONG et al., 2007; MORGAN et al., 1996; RICCARDI, 2012; SHANKARAN et al., 2007, RICCI et al., 2012, MOHAMMED; DESMULLIEZ, 2011).

Imunossensor é um biossensor que emite sinais elétricos, ópticos, eletroquímicos, termométricos, magnéticos ou micromecânicos, dentre outros, após o reconhecimento do antígeno

(citocinas ou outras proteínas, açúcares, hormônios, ácidos nucleicos, etc.) pelo anticorpo, ou vice-versa. A técnica de análise é baseada na imobilização de antígenos ou de anticorpos sobre a superfície transdutora, que transmite sinais durante a interação e o reconhecimento molecular (CALIL; SILVA, 2014; CHUNG et al., 2006; GIL et al., 1999; GONG et al., 2007; MORGAN et al., 1996; RICCARDI, 2012; SHANKARAN et al., 2007, RICCI et al., 2012, MOHAMMED; DESMULLIEZ, 2011).

Com o intuito de simplificar os processos de detecção, reduzir o tempo de análise, melhorar a sensibilidade e reduzir custos, estão sendo desenvolvidos diversos imunossensores. Dentre as técnicas de detecção final a eletroquímica, determinação óptica tais como métodos biofotônicos geram dados confiáveis e de qualidade, e têm sido frequentemente utilizadas para a detecção de antígenos, como citocinas, enzimas dentre outras substâncias. Os métodos ópticos requerem equipamentos complexos, assim, o desenvolvimento de métodos alternativos, como os eletroquímicos, que fornecem ótimos resultados com procedimento de simples execução é cada vez mais requisitado (KONGSUPHOL et al., 2014).

## 2. Material e Método

A pesquisa bibliográfica que subsidiou a presente revisão foi baseada na consulta de trabalhos publicados nos últimos 20 anos (1996 a 2016), obtidos nas seguintes Bases de dados Científicos: *ScienceDirect*, *Periódicos Capes*, *Scopus* e *Lilacs*.

Como unitermo foi utilizado “Immunosensors”, “Immunosensor” “Imunossensores”, “Imunossensores”.

No total foram obtidos inicialmente 13.126 arquivos distribuídos nas bases de dados da seguinte forma: a) *ScienceDirect* - resultou inicialmente em 6.592 arquivos publicados em

revistas, livros e referências de trabalho; b) *Periódicos Capes* – resultou em 1.675 arquivos; c) *Lilacs/BVS* – resultou em apenas 1 arquivo; d) *Scopus* – resultou em 3.744 arquivos.

O Portal *Periódicos Capes* faz busca direta nas bases de dados como o *WebScience* e *Scopus* e, por isso, foram encontrados artigos duplicados, em versões diversas. Portanto, foram excluídos e contabilizados para seleção, considerando os critérios pré-estabelecidos.

Para seleção de trabalhos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1) artigos publicados nos cinco principais periódicos da área: *Biosensors and Bioelectronics*; *Sensors and Actuators B: Chemical*; *Analytica Chimica Acta*; *Talanta*; *Electrochimica Acta*. 2) Idiomas: inglês, português e espanhol; 3) Tópicos: imunossensores, biosensores, anticorpos, eletroquímica, imunossensor eletroquímico, carbono.

Os critérios de exclusão foram: 1) teses, dissertações, comunicações em congresso, livros e referências de trabalho; 2) outros idiomas; 3) outros títulos de periódicos; 4) demais termos ou tópicos apresentados nas buscas nas bases de dados.

## 3. Desenvolvimento de Imunossensores

### 3.1 Seleção de publicações

Após exclusão de arquivos por duplicidade, ficaram um total de 8.923 artigos.

Na base de dados *Periódicos Capes* inicialmente aplicando os critérios de exclusão, foram selecionados 402 arquivos, enquanto no *ScienceDirect* foram 716 arquivos, no *Scopus* 1.415 arquivos e 0 no *Lilacs/BVS*.

Foram excluídos 201 artigos duplicados.

Inicialmente para análise foram selecionados 2.332 artigos conforme demonstrado na Figura 2.

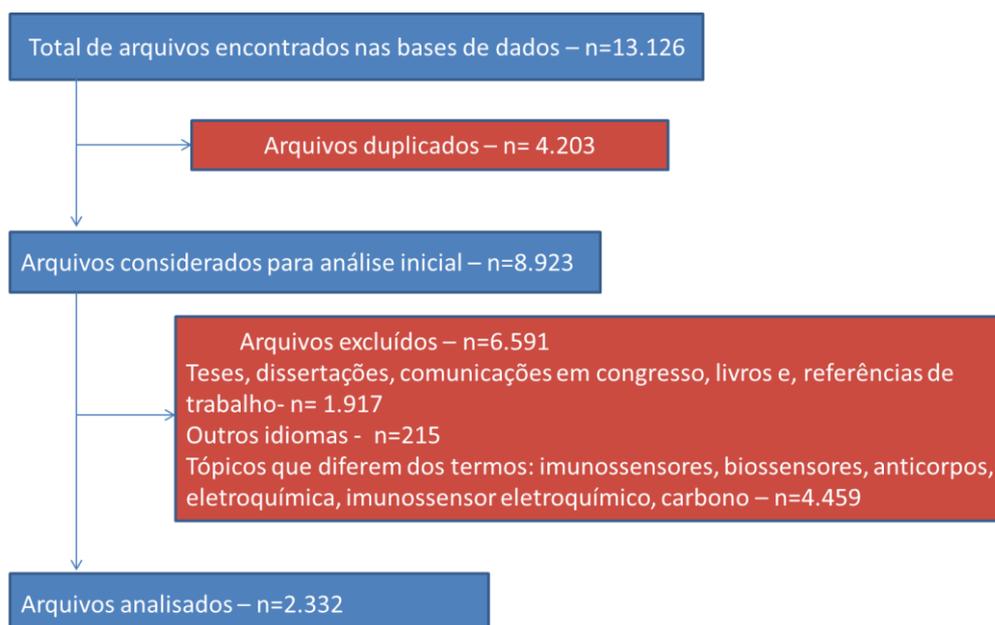


Figura 2: Fluxograma de seleção de estudos.

### 3.2 Tipos de Biossensores e Imunossensores

Os vários tipos de biossensores disponíveis envolvem sistemas de detecção enzimática, genética, imune, bioquímicas, dentre outros (BANDIERA et al., 2007; GAU et al. 2005).

O reconhecimento dos biossensores é baseado em sistemas de detecção bioquímica que podem envolver uma diversidade de moléculas, tais como: seqüências de ácidos nucleicos, anticorpos, enzimas e outras biomoléculas que se ligam às moléculas complementares ou reagem com substratos específicos (GAU et al., 2005; WANG, 2000; WANG, 2006).

Os biossensores são apresentados nos mais diferentes formatos: *beads*, nanopartículas metálicas, magnetizadas, coloidais, em nanotubos de carbono, biochips, com superfícies de diferentes materiais inorgânicos (ouro, prata, platina, vidro, quartzo, ligas metálicas, óxidos -  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , nitretos -  $\text{N}_4\text{Si}_3^-$ ), polímeros orgânicos e biomateriais (ARSLAN et al., 2006; ELSAYED; HUANG; EL-SAYED, 2005; MIYACHI et al., 2004; SOKOLOV et al., 2003; UKAJI et al., 2007; VITICOLI et al., 2006; WANG, 2000).

Segundo Carvalho e colaboradores (2003) para desenvolver um biossensor é de fundamental importância conhecer e avaliar as constantes de afinidades, de equilíbrios, fenômenos de interface (sólido/líquido) associados com interações

enzima/substrato, etc., resultando assim em biossensores mais sensíveis, seletivos, principalmente mais estáveis e com maior potencial para produção comercial.

Os imunossensores aliam reconhecimento bioquímico com sinais de transdução em sistemas de detecção de moléculas específicas, pela interação antígeno-anticorpo. O componente transdutor transforma a interação das biomoléculas em sinais reconhecíveis. As junções desses componentes desencadeiam a detecção específica e até, quantificação de moléculas alvos em amostras complexas (GAU et al., 2005; WANG, 2000; WANG, 2006).

Os imunossensores eletroquímicos são geralmente obtidos pela imobilização de um elemento de reconhecimento (o antígeno ou anticorpo) sobre a superfície do eletrodo. Nesse sistema pode ser adicionado um anticorpo secundário marcado com enzima. A adição de um substrato enzimático adequado fornecerá uma reação enzimática com produção de uma molécula eletroativa gerando um sinal que é gravado, por instrumentos de bancada ou portáteis, por meio de diferentes técnicas eletroquímicas (Figura 3). Sendo assim a construção de um imunossensor eletroquímico deve partir das seguintes etapas de seleções: da superfície do eletrodo e do processo de imobilização do elemento de reconhecimento (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

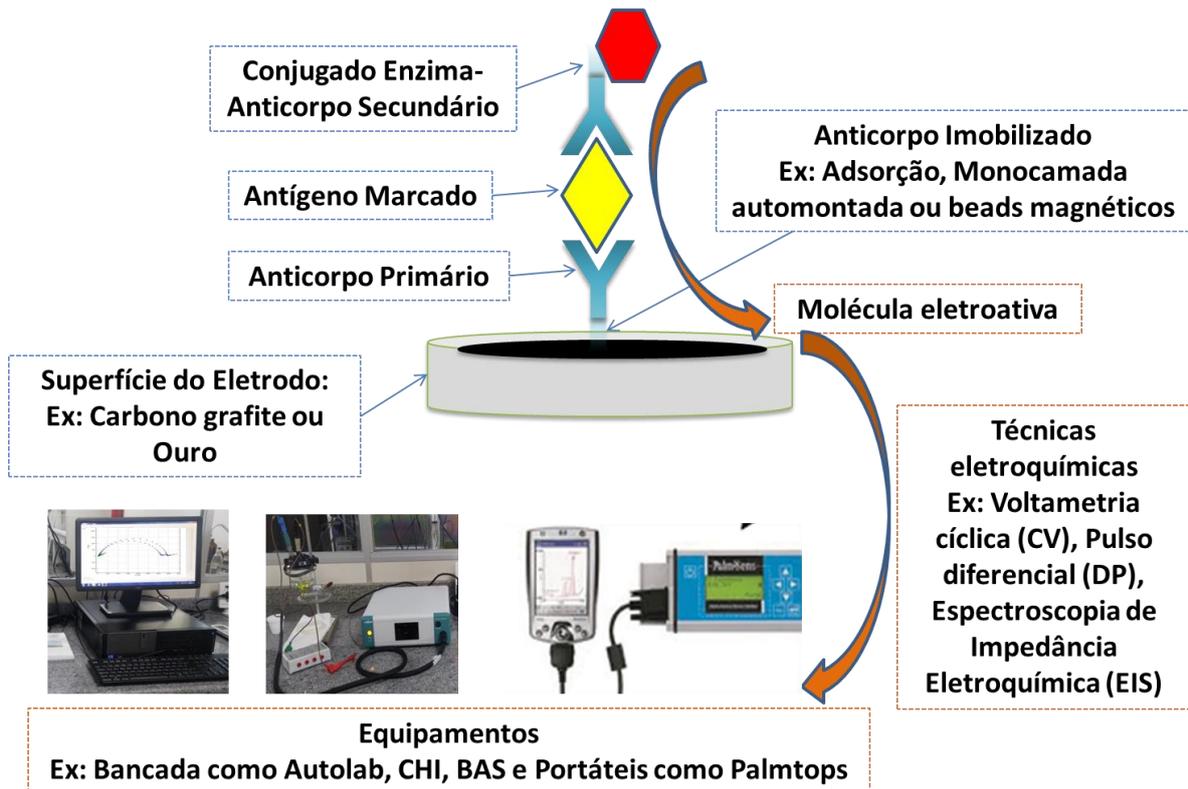


Figura 3 - Visão geral dos principais componentes de um imunossensor eletroquímico genérico, com base em um formato de sanduíche.

Fonte (adaptado): RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012.

### 3.3 Técnicas de Imobilização

Segundo MARQUES e YAMANAKA (2008) na construção de um biossensor a técnica a ser empregada na imobilização é uma etapa crítica e os tipos de procedimentos mais comuns de imobilização de material biológico podem ser classificados em: (a) adsorção; (b) encapsulação; (c) ligação covalente, e (d) ligação covalente cruzada (*crosslinking*), como podem ser observados na Figura 4.

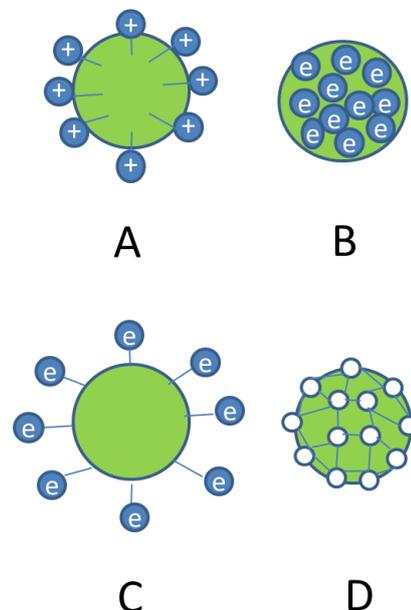


Figura 4 - Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimática: a) adsorção; (b) encapsulação; (c) ligação covalente, e (d) ligação covalente cruzada.

Fonte (adaptado): MARQUES; YAMANAKA, 2008.

A ligação covalente é a técnica de imobilização mais utilizada e se baseia na retenção da enzima, pela ligação com seus grupos funcionais, com a superfície do suporte. Porém, desvantagem dessa técnica de imobilização é a perda de parte da atividade enzimática, por conta de alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima (DIAZ; PEINADO, 1997; RETAMA et al., 2005; VIDAL et al., 2006; YANG et al., 2004).

A imobilização pela técnica da ligação covalente cruzada (*crosslinking*) é baseada na formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma rede rígida, oferecendo assim a vantagem de uma ligação enzima-enzima mais sólida. Como desvantagem pode induzir a formação de barreiras de difusão, resultando no aumento do tempo de resposta do biossensor. O glutaraldeído e o álcool polivinílico, com grupos estirilpiridínicos (PVA-SbQ) ligados, são exemplos de agentes de ligação cruzada já utilizados na construção de biossensores (ANDREESCU et al., 2002; NUNES et al., 2004).

Segundo os estudos de Makaraviciute e Ramanaviciene (2013) a sensibilidade, estabilidade e longevidade de um imunossensor, dependem da quantidade de moléculas de anticorpos imobilizados. Dessa forma, a sua estabilidade conformacional remanescente sobre a superfície, após imobilização, determina sua orientação na superfície do sensor. As imunoglobulinas (anticorpos) são compostas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas unidas por pontes dissulfetos. Apresentam duas regiões de reconhecimento de antígenos (bivalente – região Fab) e uma região constante (Fc) que caracteriza cada classe de imunoglobulinas e que define as suas funções biológicas (Figura 5). Dependendo do processo de imobilização e da porção que é imobilizada da imunoglobulina, pode dificultar a interação como antígeno (Figura 6 A).

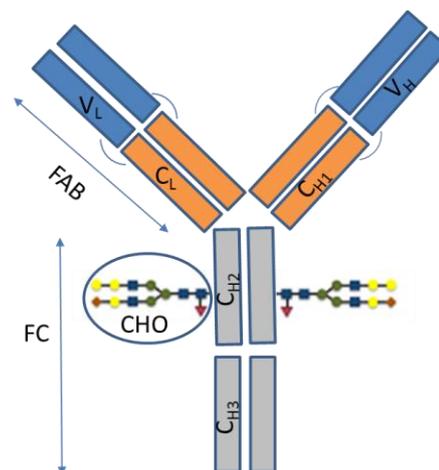


Figura 5 - Representação esquemática de uma molécula de anticorpo. Fragmento Fab, ligação ao antígeno; Fc-fragmento, cristalizável; CHO-hidrato de carbono porção; VL- domínio variável da cadeia leve; VH- domínio variável da cadeia pesada; CL- domínio constante da cadeia leve; e CH1, CH2, CH3- primeiro, segundo e terceiro domínios constante da cadeia pesada.

Fonte (adaptado): MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013.

A imobilização de anticorpos pode ainda ser do tipo orientada (sítio-dirigida), pois assegura a minimização de impedimento estérico e, consequentemente, facilita a interação antígeno-anticorpo, aumentando a sensibilidade da análise (PIETRO-SIMÓN et al., 2015).

Para Makaraviciute e Ramanaviciene (2013) a otimização de sistemas de detecção de substâncias deve concentrar-se principalmente no da imobilização do anticorpo, com local específico (sítio-dirigido) para porção ligante de interesse. Essa técnica é indicada para aplicações clínicas, por ser simples, exata e permitir a detecção do analito diretamente. As duas principais abordagens existentes que podem ser utilizadas na preparação da superfície do sensor a base de anticorpo é: aleatória e sítio-dirigida ao local de imobilização do anticorpo, que podem ocorrer de diferentes maneiras, como expressos nas figuras 6 e 7.

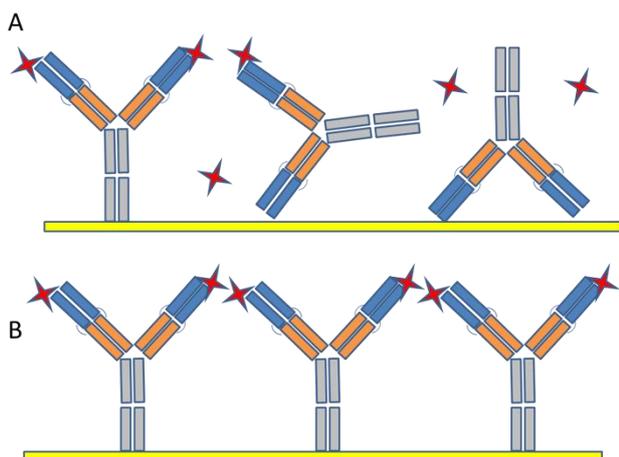


Figura 6 – Representação das duas principais abordagens de imobilização de anticorpo. A-aleatória, e B-dirigida ao local de imobilização do anticorpo.

Fonte (adaptado): MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013.

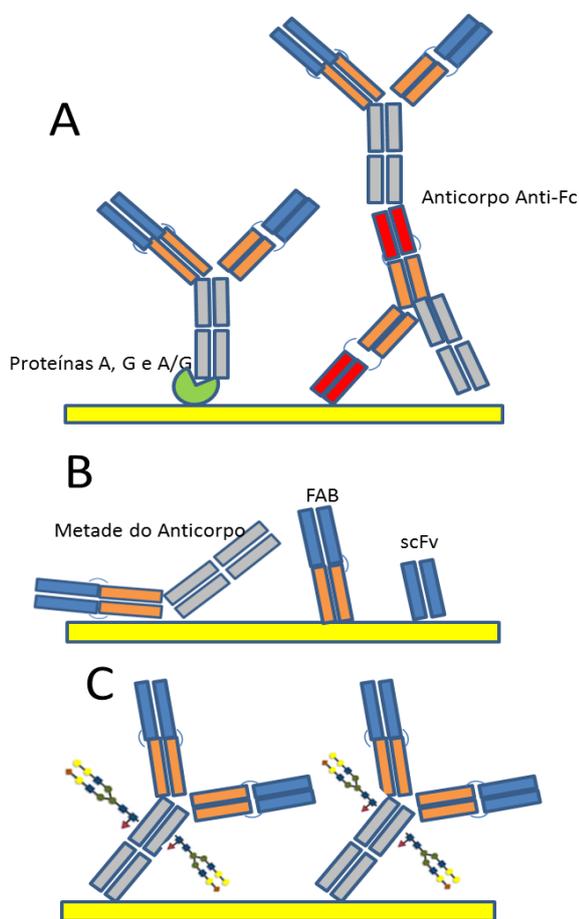


Figura 7 – Representação esquemática de métodos de imobilização de anticorpo por local indicado. (A) proteínas de ligação via Fc, (b) por meio de fragmentos de anticorpo e (c) por oligossacarídeos oxidados.

Fonte (adaptado): MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013

### 3.4 Sistemas de Transdução de Sinal, Camada Sensora e Aplicação

Dentre as diversas formas de transdução de sinal têm-se: óptica (colorimétrica, fluorescente), magnética, eletroquímica (amperométricos, potenciométricos, espectroscopia de impedância eletroquímica), piezoelétrica, etc. (CATTARUZZA et al., 2006; DONG et al., 2006; JOSHI et al., 2007; YANG et al., 2006). A Tabela 1 expressa alguns tipos de imunossensores, seus diferentes componentes e aplicações.

### 3.5 Tipos de Imunossensores

Os imunossensores têm o objetivo de trabalhar como teste POCT (*Point-of-care*) que permite diagnosticar doenças ou substâncias tóxicas, por meio de dispositivos portáteis, em qualquer lugar que o indivíduo esteja, da cabeceira de sua cama a um local distante. A conversão de imunossensores a dispositivos portáteis é fundamental para que o diagnóstico possa ser realizado em áreas rurais onde os recursos e o atendimento à saúde são escassos (GOPINATH et al. 2014).

Ao longo dos anos e pelas publicações disponíveis foram constatados inúmeros dispositivos com definição de imunossensores, que têm por finalidade propiciar maior especificidade em diagnósticos diversos.

Nos estudos de Hays, Millner e Prodromidis (2006) as monocamadas de um eletrodo foram montadas em bases de sistemas mistos utilizando compostos derivados tiol ancorados na superfície de ouro, ou pela criação de monocamadas de suporte para que as moléculas como a biotina possam ser imobilizadas.

Balkenhohl e Lisdat (2007) desenvolveram um imunossensor eletroquímico capaz de detectar anticorpos antitransglutaminase em soro humano. A sensibilidade foi alta o suficiente para indicar a sua aplicação no diagnóstico de doença celíaca. Por ser um sistema com resultados quantitativos, os dados obtidos foram superiores aos de ensaios de linha ou denominados qualitativos, que apresentam apenas como resultados: positivo (sim) ou negativo (não). Ainda assim, os dados não foram tão precisos estatisticamente que permitam afirmar, por exemplo, que esse teste é mais preciso que um realizado por *kits* comerciais de ELISA.

MORENO-GUSMÁN e colaboradores (2012) desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção rápida do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) envolvendo a imobilização de antiACTH em eletrodos

impressos de carbono modificado com ácido fenilborônicos.

Um imunoenensaio competitivo implicando ACTH biotinilado e fosfatase alcalina estreptavidina marcada foi realizado. A resposta analítica obtida foi pela análise voltamétrica de pulso diferencial para monitorizar a reação de afinidade. Resultando assim, em um eletrodo de excelente

desempenho analítico em termos de sensibilidade, seletividade, ampla gama de concentrações de antígeno quantificáveis e inter ensaio de reprodutibilidade.

Tabela 1. Tipos de imunossensores com exemplos de transdutores, camada sensora e aplicação.

SUBSTRATO	TRANSDUTOR	CAMADA SENSORA	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Membrana celulósica (rede nylon)	POTENCIOMÉTRICO E AMPEROMÉTRICO	Anticorpo Anti-IgG humano e glicose oxidase	Determinação de Anti-IgG humana	CAMPANELLA et al., 1999
Superfície de ouro	PIEZOELÉTRICO	Anticorpo antiHSA	Detecção de albuminúria	NAVRÁTILOVÁ, SKLÁDAL, VIKLICKY, 2001
Eletrodo de vidro	ÓPTICO	Glutaraldeído e DNA	Dinâmica de hibridização de DNA	WANG et al., 2002.
Nanopartícula de Ouro	ÓPTICO	Polietilenoglicol e Anticorpo AntiEGFR.	Detecção de câncer	EL-SAYED; HUANG; EL-SAYED, 2005; SOKOLOV et al., 2003.
Nanopartículas de (dióxido de titânio)-TiO <sub>2</sub>	VOLTAMÉTRICO	Glicose oxidase	Diagnóstico e controle da diabetes	VITICOLI et al., 2004.
Nanopartícula de prata	AMPEROMÉTRICA	Polivinil butiral (PVB), Glutaraldeído e glicose oxidase.	Detecção de glicose	REN et al., 2005.
Nanotubos de carbono	AMPEROMÉTRICO	Glutaraldeído e glicose oxidase	Diagnóstico e controle da diabetes	TKAC; WHITTAKER; RUZGAS, 2007; ZOU et al., 2006.
Eletrodo de vidro	AMPEROMÉTRICO E IMPEDIMÉTRICO	Glutaraldeído e glicose oxidase	Detecção de desordens neurológicas	MAALOUF et al., 2006.
Superfície de ouro	ÓPTICO	Ácido Mercaptoundecanóico, Carbodiimida (EDC), N- hidroxisuccinimida (NHS) e IgG.	Detecção de câncer	CHUNG; BERNHARDT; PYUN, 2006
Superfície de ouro	PIEZOELÉTRICO	Mercaptoundecanóico, Carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e IgG.	Detecção de câncer	GRONEWOLD et al., 2006
Superfície de ouro	IMPEDIMÉTRICO	Biotina	Detecção de cristais de quartzo	HAYS, MILLNER e PRODROMIDIS, 2006
Superfície de ouro	ÓPTICO	Cisteamina, Carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e Troponina cardíaca.	Detecção do infarto do miocárdio	DUTRA et al., 2007.
Nanopartícula de Ouro e ponto quântico	ELETROQUÍMICA E ÓPTICO	Carbodiimida (EDC), Glicose oxidase e DNA.	Detecção de câncer	WILLNER; BARON; WILLNER, 2007.
Nanopartícula de sílica e prata magnetizada	MAGNÉTICA E ÓPTICA	Aminopropiltriétoxisilano (APTS), DETA, Glutaraldeído e Anticorpo Anti-IgG	Detecção de câncer	GONG et al., 2007
Eletrodo impresso de ouro	ELETROQUÍMICA	Anticorpos antitransglutaminase em soros humanos	Diagnóstico de doença celíaca	BALKENHOHL, LISDAT, 2007
Eletrodo impresso de carbono	ELETROQUÍMICA	Anticorpo monoclonal antiácido ocaídoico (antiOA-MAb)	Detecção de ácido ocaídoico em amostra de músculo	HAYAT; BARTHELMEBS; MARTY, 2012
Eletrodo impresso de carbono	ELETROQUÍMICA IMPEDIMÉTRICA	Anticorpo antiACTH, ACTH biotilado, fosfatase alcalina, estreptavidina marcada	Detecção de ACTH	MORENO-GUSMÁN et al., 2012
Superfície de ouro	ELETROQUÍMICA IMPEDIMÉTRICA	Anticorpo para receptor de lipoproteína AntisLOX1	Detecção de Troponina Cardíaca I	BILLAH et al., 2012
Nanopartículas de Platina mesoporosas não enzimático	ELETROQUÍMICO	Anticorpos AntiCA125, antiCA153 e antiCEA (Ab1)	Detecção de três tipos de marcadores tumorais de câncer de mama	CUI et al., 2014
Nanotubos de carbono em superfície de ouro	VOLTAMÉTRICO (PULSO DIFERENCIAL)	Anticorpo policlonal adaptado nanotubos de carbono de parede única	Determinação De contaminação microbiana	PRIETO-SIMÓN et al., 2015

Em geral, segundo Ricci, Adornetto, Palleschi, (2012) a sensibilidade de imunossensores eletroquímicos não é comparável a de métodos conjugados com enzima, no entanto, conduzem a limites de detecção suficientemente baixos, sendo, portanto, úteis para aplicações práticas, além de serem menos propensos a interferência do que os imunossensores ópticos. As vantagens dos modelos eletroquímicos estão na diversidade de opções de eletrodos disponíveis para o público, de instrumentos, de marcadores enzimáticos e de reagentes. Além dessas podem ser adicionadas as vantagens relacionadas ao pequeno nível de interferências eletroquímicas em amostras clínicas ou alimentares complexas, redução ou eliminação de etapas de lavagem ou adição de reagentes externos acoplados com o baixo custo e a facilidade de uso de instrumentação eletroquímica para o diagnóstico rápido, prevenção e tratamento de muitas doenças, incluindo doenças infecciosas e autoimunes.

#### 4. Considerações Finais

O desenvolvimento de imunossensor de alto desempenho, qualidade e praticidade, com possível miniaturização, são de suma relevância para aplicação na prática médica de diagnóstico e monitoramento de substâncias diversas no organismo humano.

Há uma demanda sobre o desenvolvimento de testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade e especificidade para quantificação de marcadores moleculares, como citocinas, no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como doenças autoimunes, as quais são tratadas com várias modalidades terapêuticas, de acordo com as condições clínicas dos pacientes, que são extremamente variáveis.

A concepção de um imunossensor portátil, de fácil utilização, de alta sensibilidade e especificidade, contribuirá para direcionar um tratamento mais eficaz das doenças autoimunes, nas quais são utilizadas terapias com anticorpos monoclonais direcionados para citocinas inflamatórias. Além do alto custo desses imunobiológicos, que são fornecidos pelo Ministério da Saúde, a administração de doses inadequadas torna o paciente imunossuprimido, sujeito a infecções e a outras patologias graves, durante o tratamento.

#### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

#### Referências

- ANDREESCU, S.; NOGUER, T.; MAGEARU, V.; MARTY, J. L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. **Talanta**, v. 57 (1), p. 169-176, 2002.
- ARSLAN, G. et al. Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. **Turk J Chem**, v. 30, p. 203-210. 2006.
- BALKENHOHL, T.; LISDAT F., Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 50-57. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.041>
- BANDIERA, L.; Cellere, G.; Cagnin, S.; Toni, A.; Zanoni, E.; Lanfranchi, G.; Lorenzelli, L. A fully electronic sensor for the measurement of cDNA hybridization kinetics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2108-2114. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.025>
- BILLAH, M. M.; HAYS, H. C. W.; HODGESB, C. S.; PONNAMBALAM, S.; VOHRA, R.; MILLNER, P. A. Mixed self-assembled monolayer (mSAM) based impedimetric immunosensors for cardiac troponin I (cTnI) and soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1). **Sensors and Actuators B**, v. 173 p. 361-366. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.017>
- CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. da; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Acesso em <[http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SI MONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBE RTO%20QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SI%20MONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBE%20RTO%20QUEIROZ.pdf)>, dia 23 de junho de 2014.
- CAMPANELLA, L.; ATTIOI, R.; COLAPICCHIONI, C.; TOMASSETTI, M. New amperometric and potentiometric immunosensors for anti-human immunoglobulin G determinations. **Sensors and Actuators B**, v. 55, p. 23 - 32. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00035-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00035-0)
- CARVALHO, R. M. de; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma Nova Ferramenta para Biossensores. **Química Nova**, v. 26, no. 1, p. 97-104, 2003.
- CATTARUZZA, F.; CRICENTI, A.; FLAMINI, A.; GIRASOLE, M.; LONGO, G.; PROSPERI, T.; ANDREANO, G.; CELLAI, L.; CHIRIVINO, E.

- Controlled loading of oligodeoxyribonucleotide monolayers onto unoxidized crystalline silicon; fluorescence-based determination of the surface coverage and of the hybridization efficiency; parallel imaging of the process by Atomic Force Microscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 4, 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gnj034>
- CHUNG, J.W.; BERNHARDT, R.; PYUN, J.C. Additive assay cancer marker CA 19-9 by SPR biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.118, p.28-32. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.015>
- CUI, Z.; WU, D.; ZHANG, Y.; MA, H.; LI, H.; DUA, B.; WEIA, Q.; JU, H. Ultrasensitive electrochemical immunosensors for multiplexed determination using mesoporous platinum nanoparticles as nonenzymatic labels. **Analytica Chimica Acta**, v. 807, p. 44–50. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.025>
- DIAZ, A. N.; PEINADO, M. C. R. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorometric analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 38, p. 426-431, 1997. [http://dx.doi.org/S0925-4005\(97\)00025-7](http://dx.doi.org/S0925-4005(97)00025-7)
- DONG, H.; LI, C. M.; ZHOU, Q.; SUN, J. B.; MIAO, J. M. Sensitive electrochemical enzyme immunoassay microdevice based on architecture of dual ring electrodes with a sensing cavity chamber. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 624-626. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.034>
- EL-SAYED, I. H.; HUANG, X.; EL-SAYED, M.A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Câncer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. **Nano Lett.**, v.5, n.5, p.829-834. 2005.
- GAU, V.; MA, S.-C.; WANG, H.; TSUKUDA, J.; KIBLER, J.; HAAKE, D. A. Electrochemical Molecular Analysis Without Nucleic Acid Amplification. **Methods**, v. 37, n.1, p.73-83. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.008>
- GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I.; Alguns Aspectos de Imunoensaios Aplicados À Química Analítica. **Química Nova**, v. 22, p. 874 – 881. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000600015>
- GONG, J. L.; LIANG, Y.; HUANG, Y.; CHEN, J. W.; JIANG, J. H.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1501–1507. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.004>
- GOPINATH, S. C. B.; TANG, T-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>
- HAYS, H. C. W.; MILLNER, P. A.; PRODRMIDIS, M. I. Development of capacitance based immunosensors on mixed self-assembled monolayers. **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 1064–1070. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.039>
- JOSHI, M.; KALE, N.; LAL, R.; RAMGOPAL, R. V.; MUKHERJI, S. A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomolecules in Bio-MEMS. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2429–2435. 2007. <http://dx.doi.org/>
- KONGSUPHOL, P.; NG, H. H.; PURSEY, J. P.; ARYA, S. K.; WONG, C. C.; STULZ, E.; PARK, M. K. EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- $\alpha$  from non-diluted Human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 274-279. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.017>
- LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F.J.; MUÑOZ, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1205-1217. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460–471. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.060>
- MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biosensores Baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799. 2008.
- MARTINS, T. D.; RIBEIRO, A. C. C.; CAMARGO, H. S.; FILHO, P. A. C.; CAVALCANTE, H. P. M.; DIAS, D. L. New Insights on Optical Biosensors: Techniques, Construction and Application. **INTECH. State of the Art in Biosensors - General Aspects**-ch. 5, p. 111-140. 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/52330>
- MIYACHI, H. Ikebukuro, K.; YANO, K.; ABURATANI, H.; KARUBE, I. Single nucleotide polymorphism typing on DNA array with hydrophobic surface fabricated by plasma-polymerization technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p.184-189. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.02.022>
- MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab on a Chip**, v. 11, n 4, p. 569-595, 2011. <http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00204f>
- MORENO-GUZMÁN, M.; OJEDA, I.; VILLALONGA, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 82–86. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.01>

- MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P.; Immunosenors: technology and opportunities in laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 193-209. 1996.
- NAVRÁTILOVÁ, I.; SKLÁDAL, P.; VIKLICKÝ, V. Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria. **Talanta**, v. 55, p. 831–839. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00512-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00512-4)
- NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 107-115, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.100>
- PRIETO-SIMÓN, B.; BANDARU, N.M.; SAINT, C.; VOELCKER, N.H. Tailored carbon nanotube immunosensors for the detection of microbial contamination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 642–648. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.089>
- RETAMA, J. R.; LÓPEZ, M. S.; PÉREZ, J. P. H.; CABANILLAS, G. F.; LÓPEZ CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. A comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 11, p. 2268-2275, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.011>
- RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200020>
- RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>
- SHANKARAN, D. R.; GOBI, K.V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 121, p. 158–177. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.014>
- SOKOLOV, K. FOLLEN, M.; AARON, J.; PAVLOVA, I.; MALPICA, A.; LOTAN, R.; RICHARDS-KORTUM, R. Real Time Vital Optical Imaging of Pre cancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles. **Cancer Research**, v. 63, p. 1999-2004. 2003.
- UKAJI, E. FURUSAWA, T.; SATO M.; SUZUKI N. The effect of surface modification with silane coupling agent on suppressing the photo-catalytic activity of fine TiO<sub>2</sub> particles as inorganic UV filter. **Applied Surface Science**, v. 254, p. 563-569. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.06.061>
- VIDAL, J. C.; ESTEBAN, S.; GIL, J.; CASTILLO, J. R. A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. **Talanta**, v. 68, p. 791-799, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.038>
- VITICOLI, M.; CURULLI, A.; CUSMA, A.; KACIULIS, S.; NUNZIANTE, S.; PANDOLFI, L.; VALENTINI, F.; PADELETTI, G. Third-generation biosensors based on TiO<sub>2</sub> nanostructured films. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, p. 947-951. 2006.
- WANG, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1887-1892. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027>
- WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.16, p.3011-3016. 2000. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.16.3011>
- YANG, X.; ZHOU, Z.; XIAO, D.; CHOI, M. M. F. A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, p.1613-1620. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2005.08.004>
- YANG, Y.; YANG, M.; WANG, H.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 102, p. 162-168, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.016>

## **PARTE 2 – ARTIGO ORIGINAL**

# IMUNOSSENSOR DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ), POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIS)

Luana Kelly Lima Santana<sup>g\*</sup>, Philipi Cavalcante Ricardo<sup>h</sup>, Ricardo Lima Serudo<sup>i</sup>,  
Michella Lima Lasmar<sup>j</sup> e Maria Cristina dos Santos<sup>k</sup>

## Resumo

O Fator de Necrose Tumoral - Alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida por diferentes células de defesa do organismo e que participa da ativação das respostas inflamatória e imune. Em situações de doenças inflamatórias crônicas como Artrite Reumatoide (AR), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Doenças Inflamatórias do Intestino (Doença de Crohn, Colite Ulcerativa), Psoríase, dentre outras, essa citocina pode ser detectada em altas concentrações séricas. A quantificação de TNF- $\alpha$  no soro humano tanto em rotina laboratorial médica quanto em pesquisa é feita, principalmente, pelos testes imunoenzimáticos de absorvância como ELISA. Atualmente estudos buscam desenvolver testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade e especificidade para quantificação de TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como as doenças autoimunes. No presente estudo foi desenvolvido um imunossensor, para detecção de TNF- $\alpha$ , utilizando a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). Para isso, foram produzidos eletrodos modificados com carbono grafite em uma camada automontada contendo carvão, óleo mineral, glutaraldeído e passivado com caseína de leite em pó comercial. O anticorpo utilizado para imobilização na camada foi o Infliximabe (Remicade<sup>®</sup>). Para a verificação de sua especificidade, foram testados como antígeno as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Pelo emprego da técnica de EIS o sistema imunossensor foi comparado em ranges de 1-1000 pg.mL<sup>-1</sup> e por adição sucessiva à solução da célula eletroquímica. Nos resultados obtidos foram constatados seletividade do eletrodo, de modo que o imunossensor apresentou somente leitura para reação com TNF- $\alpha$ , não reagindo, portanto, com as outras citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6. O valor da curva analítica ficou em torno de 0,9350, comprovando assim que o imunossensor é específico e sensível para o TNF- $\alpha$ .

**Palavras-chave:** quantificação, citocina, terapia com anticorpo.

---

Correspondência aos autores: Secretaria Municipal de Saúde de Manaus e Universidade Paulista – UNIP. Avenida Adolfo Ducke, 1221 – Conjunto Acariquara – Coroado III, Manaus, AM. CEP 69082-653. E-mail: luana.lima.santana@gmail.com.

<sup>g\*</sup> Secretaria Municipal de Saúde de Manaus e Universidade Paulista – UNIP. Avenida Adolfo Ducke, 1221 – Conjunto Acariquara – Coroado III, Manaus, AM. CEP 69082-653. E-mail: luana.lima.santana@gmail.com.

<sup>h</sup> Escola de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

<sup>i</sup> Escola de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

<sup>j</sup> Escola de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

<sup>k</sup> Laboratório de Imunoquímica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil.

## 1. Introdução

O Fator de Necrose Tumoral - Alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida, principalmente, por fagócitos mononucleares ativados (macrófagos), embora, os linfócitos T efetores, células NK e mastócitos, também secretem essa proteína (Aggarwal, 2003; IBL, 2012; Pfeffer, 2003). O TNF- $\alpha$  participa da ativação de várias respostas celulares, como: morte, sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração celular (Bradley, 2008; Kongsuphol et al., 2014; Idriss; Naismith, 2000).

A Artrite Reumatóide (AR) apontada como uma das doenças autoimunes mais frequentes acomete articulações por um invasivo e destrutivo infiltrado de linfócitos, macrófagos e sinoviócitos, e o TNF- $\alpha$  é apontado como um dos responsáveis por esse intenso quadro inflamatório (Feldman; Maini, 2003; Klimiuk et al., 2001; Lee; Weinblatt, 2001; Rossol et al., 2005; Sánchez-Pernaute, 2008).

Assim como na Artrite Reumatóide (AR), o TNF- $\alpha$  pode ser detectado em altas concentrações séricas em outras doenças como o Câncer, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Doença Inflamatória do Intestino (Doença de Crohn, Colite ulcerativa), Psoríase, doenças pulmonares (Fibrose cística, Asma), Espondilite Anquilosante, transplante (doença do enxerto contra hospedeiro, rejeição do aloenxerto), Aterosclerose, Calcificação arterial e doenças neurodegenerativas (Esclerose Múltipla, Doença de Alzheimer, Doença de Prion, Doença de Parkinson) (IBL, 2012).

Na AR, os receptores tipo Toll 2, 3 e 4, presentes nas células locais das articulações comprometidas, são ativados e estimulam a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e interleucina-6 (Sánchez-Pernaute, 2008).

A ligação do TNF- $\alpha$  com doenças autoimunes está bem estabelecida e a incidência destas enfermidades tem aumentado gradativamente nos últimos anos, com valor estimado de prevalência acima de 2% da população geral. Somente a AR apresenta prevalência estimada entre 0,5 - 1% da população mundial, variando conforme o grupo populacional estudado. Um dos tratamentos-chave dessas doenças é a neutralização ou bloqueio de citocinas, presentes nestes processos inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  (Castro-López et al., 2014; Tobón et al., 2010).

Os anticorpos monoclonais terapêuticos, agentes imunobiológicos, desenvolvidos por pesquisas em Biotecnologia, para neutralizar citocinas pró-inflamatórias são indicados para o controle de doenças autoimunes. Dentre esses estão os que atuam como receptores para o TNF- $\alpha$ , denominados antiTNF- $\alpha$ . Esses imunobiológicos apresentam vantagens sobre outros medicamentos clássicos, como os DMARDs (drogas modificadoras do curso da doença) por sua especificidade contra alvos terapêuticos definidos e com papel conhecido no tratamento de algumas doenças. Porém, produzem efeitos indesejáveis como desencadeamento de síndromes semelhantes ao lúpus, induzido por fármacos, ou ainda formação de anticorpos antinucleares (ANA), evento frequente em doentes sob terapêutica com Remicade® (infiximabe) (Braun; Sieper, 2004; Carvalho Junior et al., 2009; Cruvinel et al., 2008; Furst et al., 2005; Machold et al., 2006; Moreno et al., 2006; Sociedad Chilena de Reumatologia, 2008).

O TNF- $\alpha$  por suas ações nas respostas inflamatória e imune é uma citocina importante no controle de doenças infecciosas e, por este motivo, a terapia com antiTNF tem se tornado uma preocupação entre os

pesquisadores, pois existem poucas informações sobre seus efeitos colaterais. Os relatos existentes mostram, que o uso prolongado desses imunobiológicos podem desencadear infecções oportunistas, como a tuberculose latente, o surgimento de infecções granulomatosas, como a listeriose, coccidiomicose ou histoplasmose (Cravo et al., 2006; Faleiro et al., 2011).

Apesar disso, vários neutralizadores ou bloqueadores de TNF- $\alpha$  e, também para outras citocinas pró-inflamatórias foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos. No Brasil, para o TNF- $\alpha$ , estão disponíveis o Remicade<sup>®</sup> (infliximabe), o Enbrel<sup>®</sup> (etanercepte) e o Humira<sup>®</sup> (adalimumabe), que ainda não possuem relatos de superioridade terapêutica em relação à outros antiinflamatórios comuns. Entretanto, devidos aos fatores como: acesso à terapia limitado, a ocorrência de efeitos adversos, alto custo do tratamento, aplicação em nível hospitalar, variável eficácia do tratamento entre os pacientes e a perda da resposta de drogas pela evolução da doença, obriga o monitoramento do TNF- $\alpha$  circulante, em pacientes usando soro ou plasma para avaliar tanto a eficácia do tratamento como o prognóstico da doença (Castro-López et al., 2014; Faleiro et al., 2011).

O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico anti-IgG1, sua região de ligação é composta por porção ou domínio murínico (região variável) e uma porção ou domínio da molécula de IgG1 humana (região constante) (Abreu; Ciconelli, 2005; Bertolo, 2008; Ciconelli, 2005; Cruvinel et al., 2008; Liu et al., 2008; Martins; Andrade, 2005). O infliximabe inibe as ações biológicas do TNF- $\alpha$  devido sua alta afinidade e especificidade entre o anticorpo e o TNF- $\alpha$  solúvel ou aquele ligado à membrana. Esse anticorpo também promove a morte de células que expressam TNF- $\alpha$  em sua superfície pelo de mecanismo citotóxico dependente de anticorpos e de componentes do Sistema Complemento (Lima; Giorgi, 2008; Silva et al., 2003).

Diversas técnicas de imunoensaios são utilizadas para detecção de TNF- $\alpha$ . Dentre estas podemos citar: ELISA (Bobbio-Pallavicini et al., 2004; Chamberland et al., 2008; JOHNSON & JOHNSON, 2004; Klimiuk et al., 2001), Citometria de Fluxo (Kronqvist et al., 2008), Western Blot (Montecucco et al., 2008), dentre outras. Porém, a quantificação de TNF- $\alpha$  em soro humano tanto em rotina laboratorial médica quanto em pesquisa é realizado com maior frequência pelo teste de ELISA, considerado ainda como padrão ouro (Shrivastava et al., 2014). Para esse teste, existem inúmeros “kits” comerciais disponíveis no mercado com alta sensibilidade e eficiência. Entretanto, esta técnica apresenta altos custos, com necessidade de laboratório equipado e recursos humanos bem treinados para execução, além de múltiplas etapas para realização e tempo mínimo de quatro horas para obtenção do resultado final.

Os métodos eletroquímicos, executados por biossensores são atualmente um foco de investigação, apesar das dificuldades referentes à reprodutibilidade desses métodos, a estabilidade de enzimas e outros agentes biológicos. Por isso, podem ser encontrados na literatura muitos estudos sobre o desenvolvimento de novos materiais transdutores, assim como técnicas de imobilização (Gil; Melo, 2010).

Carvalho e colaboradores (2003) afirma que para desenvolver um biossensor é de fundamental importância conhecer e avaliar as constantes de afinidades, de equilíbrios, fenômenos de interface (sólido/líquido) associados com interações enzima/substrato, etc., resultando assim na obtenção de

biossensores mais sensíveis, seletivos e principalmente mais estáveis e com maior potencial para produção comercial. Portanto, deve-se usar as medidas voltamétricas e SPR (Ressonância de Plasma de Superfície) como fonte de informações sobre os processos eletroquímicos no campo da eletroquímica.

Há uma demanda para o desenvolvimento de testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade e especificidade para quantificação de TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como as doenças autoimunes, que necessitam utilizar terapias de acordo com sua condição clínica extremamente variável. Corcoran e colaboradores (1994) construíram biossensor em sistema BIAcore® (SPR), contendo uma matriz de dextrano sobre superfície de ouro, na qual foi imobilizada a citocina, TNF- $\alpha$ , em concentração de 50 $\mu$ g/mL e injetado no equipamento de SPR o TNF-R (p55) para caracterizar o envolvimento de quatro repetições ricas em cisteína do receptor do TNF p55 humano do TNF (composto por domínios extracelulares dos receptores de TNF p55 e p75) e linfotoxina (LT, fator de necrose tumoral-beta) de ligação por ambas as formas ligada à membrana e solúvel do receptor.. Liu e colaboradores (2004) criaram um imunossensor de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM) integrado a um sistema de Análise de Fluxo de Injeção (FIA), para investigar a interação entre TNF- $\alpha$  humano e anticorpos monoclonais, em tempo real. Chamberland e colaboradores (2008) desenvolveram um biossensor de monitoramento de ação de drogas anti TNF- $\alpha$ . Para isso, utilizaram nanoestruturas (nanorods) de ouro conjugadas com Etanercept (receptor de TNF- $\alpha$  fusionado à porção Fc de imunoglobulina) que foram injetadas em líquido sinovial, na calda de ratos, com artrite reumatoide induzida. Em seguida, imagens das articulações dos animais foram geradas com o emprego da técnica de Tomografia Fotoacústica (PAT). Nas áreas que apresentaram maior foco inflamatório, foram detectados contrastes nas regiões de interação entre os nanorods e o TNF- $\alpha$ .

Portanto, o desenvolvimento de imunossensor de alto desempenho, qualidade e praticidade, com possível miniaturização, são de suma relevância para aplicação na prática médica de diagnóstico e monitoramento do TNF- $\alpha$  circulante. Devido ao uso indiscriminado de antiTNF- $\alpha$ , em pacientes não produtores de altas concentrações dessa citocina, e o favorecimento de doenças ocasionadas por parasitas oportunistas, o desenvolvimento de um imunossensor é fundamental para determinar em tempo real se um paciente necessita ou não do uso de antiTNF- $\alpha$ . Por isso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um imunossensor para quantificação de TNF- $\alpha$  circulante utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), para futuramente possibilitar o monitoramento do TNF- $\alpha$  liberado, o diagnóstico e a seleção de conduta terapêutica a ser administrada em pacientes portadores de doenças autoimunes ou de outras doenças inflamatórias crônicas.

## 2. Materiais e Métodos

### a. Materiais químico e biológico

Carbono Vulcan (VXC72) do fabricante CABOT (Brasil), Glutaraldeído (pentan-1,5-dial) do fabricante Labsynth (Brasil), óleo mineral do fabricante União Química (Brasil), Solução de Cloreto de Potássio (KCl preparada a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>), Solução de Ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] preparada a 10 mmol.L<sup>-1</sup>), Solução de Ferrocianeto de potássio (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] preparada a 10 mmol.L<sup>-1</sup>), Solução de leite

desnatado da Marca Molico<sup>®</sup> do fabricante Nestle<sup>®</sup> (Brasil) e Tween 20 do fabricante Labsynth (Brasil) (preparada a 5% com 5 gotas de Tween), Solução Tampão de Fosfato Salino (PBS) preparada a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> 1x, Anticorpo Infliximabe - Remicade<sup>®</sup> (infiximabe 100 mg) do fabricante Schering-Plough (Irlanda), Citocina TNF- $\alpha$  do kit Human TNF ELISA Kit II OptEIA<sup>™</sup> do fabricante BD Biosciences (EUA), Citocina IL-1 do kit Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit II OptEIA<sup>™</sup> do fabricante BD Biosciences (EUA), Citocina IL-6 do kit Human IL-6 ELISA Kit II OptEIA<sup>™</sup> do fabricante BD Biosciences (EUA).

Todas as soluções foram preparadas com diluente água ultrapura obtida do processo de purificação por equipamento do tipo Milli-Q<sup>®</sup> do Fabricante Merck Millipore (Alemanha).

### **b. Equipamentos**

Balança analítica de Modelo ED224S do fabricante SARTORIUS AG (Alemanha), Vortex Mixer basic Modelo K45-2820 - 2.800rpm 220V/60Hz com plataforma, do fabricante KASVI (Brasil), Potenciostato/Galvanostato  $\mu$ AutolabIII com módulo de impedância FRA2 do fabricante MULTI LAB MThrom (Holanda).

### **c. Construção do eletrodo e monocamada**

A base do corpo do eletrodo foi produzida a partir de tarugos de Nylon com 12,7 mm de diâmetro e 120 mm de comprimento total, e que foram previamente perfurados até 4 mm de profundidade por broca mecânica de 6 mm de diâmetro.

Os eletrodos produzidos ocos serviram para inserir fio de cobre e minidiscos de cobre. Sobre os minidiscos foi adicionada a pasta de carbono contendo 1g de Carbono Vulcan macerado com 1000  $\mu$ L de glutaraldeído preparado a 5% e 80 gotas de óleo mineral.

## **2.3 Imobilização do anticorpo**

Foram produzidos quinze eletrodos modificados (trabalho) contendo a pasta de carbono. Os anticorpos foram imobilizados na pasta pela técnica de imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído. Cada eletrodo com monocamada foi exposto a solução de Anticorpo Remicade<sup>®</sup> (infiximabe) a uma concentração de 125  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> por período de 30 minutos. Em seguida cada eletrodo foi lavado, por 3 vezes, com solução Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

Com o objetivo de impedir que o anticorpo ou antígeno se ligasse nas vacâncias (espaços) da monocamada, cada eletrodo foi imerso em 1,5 mL de solução de bloqueio contendo leite desnatado Molico<sup>®</sup> 5% e 20 gotas de Tween 20 por período de 10 minutos. Cada eletrodo foi lavado, por 3 vezes, com solução Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

## **2.4 Procedimento do Teste Eletroquímico (Imunossensor)**

#### 2.4.1 Testes com concentrações distintas de citocinas

Sobre a superfície dos eletrodos contendo anticorpo imobilizado, foi adicionada solução de TNF- $\alpha$  nas concentrações de 1 pg.mL<sup>-1</sup>, 5 pg.mL<sup>-1</sup>, 10 pg.mL<sup>-1</sup>, 25 pg.mL<sup>-1</sup>, 100 pg.mL<sup>-1</sup> em triplicata por período de 30 minutos. Cada eletrodo foi lavado, por 3 vezes, com solução Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

Ainda, foram testados em outro momento, em mais outros eletrodos, em triplicata, por adição TNF- $\alpha$  nas concentrações de 62,5 pg.mL<sup>-1</sup>, 125 pg.mL<sup>-1</sup>, 250 pg.mL<sup>-1</sup>, 500 pg.mL<sup>-1</sup>, 1000 pg.mL<sup>-1</sup>. Cada eletrodo foi lavado, por 3 vezes, com solução Tampão Fosfato Salina (PBS) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

Em ambos os testes após a lavagem procedeu-se a montagem da célula eletroquímica. (Figura 1)

#### 2.4.2 Testes de adição sucessiva de citocinas na solução da célula eletroquímica.

Diferentemente do teste anterior, o TNF- $\alpha$  foi adicionado à solução da célula eletroquímica de forma sucessiva, para detectar aumento da concentração através do diferencial de potencial gerado com o aumento dessa concentração após decorridos o tempo de 30 minutos. Um único eletrodo de trabalho (monocamada modificada) foi utilizado, imerso na célula eletroquímica. Assim como no teste do item 2.4.1 como controle negativo foram utilizadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 que são liberadas no sangue nas reações inflamatórias, essa última importante no quadro clínico da AR (Figura 2).

#### 2.4.3 Ajuste de parâmetros e leituras

Para realização de leituras pela técnica de impedância eletroquímica (EIS), os parâmetros do range de potencial elétrico foram programados para Amplitude de +0,01V, +0,1V e +0,25V, Frequência de 10000-0,1 Hz.

Na célula eletroquímica contendo o eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência foi adicionada 10 mL de solução contendo 9 mL de solução de cloreto de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, 0,5 mL de solução de ferricianeto de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 0,5mL de solução de ferrocianeto de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> no teste de concentrações diferentes de citocinas e para os testes de adição sucessiva substituiu-se o cloreto de potássio por 9 mL da solução Tampão Fosfato Salina PBS 0,1 mol.L<sup>-1</sup> 1x.

Realizadas as medidas pela técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) adaptada a partir de Sadik et al. (2003), com uso de três eletrodos: modificado ou de trabalho, contra eletrodo de platina e eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Os dados obtidos foram convertidos em sinais gráficos pelo Software NOVA<sup>®</sup>, licenciado para o potenciostato.

### 3. Resultados e Discussão

A camada automontada foi confeccionada com a inserção de moléculas químicas funcionais, como glutaraldeído e carbono, as quais promoveram interações químicas mais estáveis entre as superfícies e essas biomoléculas, anticorpo e antígeno. O que proporcionou construção de membranas com reprodutibilidade e estabilidade significativas, conforme estudos anteriormente descritos por Mendes (2008).

Para a caracterização das camadas, foram realizadas análises por EIS a cada etapa do procedimento de construção do eletrodo e desenvolvimento do imunossensor as quais demonstraram a adição de glutaraldeído, a imobilização do anticorpo e adição do bloqueio.

O processo de bloqueio foi fundamental para o preenchimento dos espaços vazios na monocamada e, assim, impedir ligações não específicas, interações fracas e até mesmo deposição de citocina ou anticorpo que desencadeasse de forma equívoca qualquer impedimento estérico pela superposição desses, resultando em erro de leitura por EIS.

#### **a. Diferentes concentrações**

O teste foi realizado em triplicata, produzidos no total 15 eletrodos que foram manualmente ajustados quanto a adição da pasta de carbono, que demonstraram resposta e intensidade diferente de TNF- $\alpha$ . Para as concentrações distintas o melhor parâmetro testado de potencial elétrico de amplitude foi o de +0,1V, observa-se a formação de semicírculo de impedância, não há uma correlação direta nos valores de Rct que demonstrem que conforme se aumenta a concentração haverá aumento ou redução deste. O fato dos eletrodos terem sido construídos manualmente faz com que haja variações na superfície, tornando-a heterogênea, o que por sua vez afeta as características medidas no teste EIS, acarretando assim oscilações nas interações antígeno-anticorpo e perda de sensibilidade.

Nos testes com IL-1 $\beta$  e IL-6 nas mesmas concentrações e condições utilizados no teste com TNF- $\alpha$  observa-se a não formação de semicírculo de impedância característico para gráficos de Nyquist, confirmando a especificidade do biossensor para TNF- $\alpha$ . Para estas citocinas os melhores parâmetros testados foram de +0,1 e 0,25 V. Esses resultados são importantes, pois as duas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 são liberadas, juntamente com o TNF- $\alpha$ , também no sangue nas respostas aos agentes infecciosos ou em doenças inflamatórias crônicas (Figuras 3 e 4).

Em outro teste comparando eletrodos de ouro e interação antígeno-anticorpo, Kongshupol e colaboradores (2014) compararam TNF- $\alpha$  e IL-2 em soro humano nas concentrações de 1-1000 pg.mL<sup>-1</sup>, observaram que o eletrodo detectava a presença de IL-2 com formação de semicírculo a curva de normalização do Rct, comprovando não ter qualquer relação de intensidade de picos máximos no gráfico de Nyquist para concentrações diferentes, atestando assim a especificidade do imunossensor ao TNF- $\alpha$ .

Observa-se no resultado deste trabalho uma relação inversa entre as diversas concentrações testadas de TNF- $\alpha$  (1-1000 pg.mL<sup>-1</sup>), intensidade do pico x concentração, por exemplo maior concentração com menor pico, assim como também foi observado no trabalho de Kongsuphol e colaboradores (2014), característica de moléculas presentes que obstruem a transferência de carga elétrica principalmente em altas concentrações de TNF- $\alpha$ .

Nos trabalhos de Pui e colaboradores (2013) foi testada a detecção de TNF- $\alpha$  secretado de células do tipo Jurkat (linhagem de linfócitos T – derivadas da leucemia/linfoma de células T) cultivadas em meio para cariótipo para multiplicação de linfócitos in vitro RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), de 1-10.000 pg.mL<sup>-1</sup> e comparadas ao IFN- $\gamma$  (interferon gama) e TNF- $\alpha$ , de 1-1000 pg.mL<sup>-1</sup>, comerciais por EIS, comprovando assim também ser sensível e específico.

### **b. Adição sucessiva**

Na Figura 5 observa-se, pelos gráficos de Nyquist em (a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-6 e (c) IL-1 $\beta$ , que à medida que se adiciona TNF- $\alpha$  à solução da célula eletroquímica, há formação de semicírculos de intensidade variável e crescente, de acordo com cada concentração. Embora quando se atinge a concentração de 852 pg.mL<sup>-1</sup> o sinal permaneça constante devido a possível saturação da solução ou outras reações dinâmicas que possam contribuir para perda de sensibilidade. Ainda assim, é possível construir curva de normalização de Rct onde o valor obtido de R = 0,9350.

Na leitura por EIS de IL-6 não há formação do semicírculo nas quatro primeiras leituras, porém a partir da quinta análise o processo dinâmico do eletrodo faz com que a superfície apresente uma pequena formação de semicírculo de impedância, provavelmente devido a degradação do Anticorpo antiTNF- $\alpha$ .

### **c. Seletividade**

Ao utilizar IL-1 $\beta$  e IL-6 como controle negativo, observa-se nas figuras 3, 4 e 5 que assim como em trabalhos antes divulgados por Kongsuphol e colaboradores (2014), onde testou-se com IL-2, não houve interação antígeno-anticorpo, confirmando que o imunossensor é específico para detecção de TNF- $\alpha$ . Em outro estudo publicado por Liu e colaboradores (2013) de imunossensor eletroquímico para detecção de TNF- $\alpha$  em amostras de sangue, o limite de detecção dessa citocina foi de 10 ng.mL<sup>-1</sup>. Enquanto, pelo ensaio de ELISA, esse limite de detecção foi de 15 pg.mL<sup>-1</sup> num range de detecção de 15 – 1000 pg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos no presente trabalho e no de Kongsuphol e colaboradores (2014) o limite de detecção foi de 1 pg.mL<sup>-1</sup> em um range de 1-1000 pg.mL<sup>-1</sup>, confirmando assim que imunossensor é específico e sensível até mesmo em amostras de soro líquido.

Em outro teste de seletividade Liu e colaboradores (2012) compararam a detecção de TNF- $\alpha$  com as citocinas IL-2, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e BSA 1% e constaram num range de 50 a 100 ng.mL<sup>-1</sup> que não houve interação dessas citocinas com o eletrodo, demonstrando que imunossensor foi específico para detecção de TNF- $\alpha$ .

## **4. Conclusões**

O range do potencial elétrico da amplitude foi programado para três amplitudes diferentes de +0,01V, +0,1V e +0,25V, pois fora desse intervalo o glutaraldeído provavelmente degrada, sofrendo reações de oxidação. E ainda, pode-se observar que o melhor parâmetro para teste e detecção do TNF- $\alpha$  foi na amplitude de +0,25V, que apresentou melhor correlação, principalmente pela técnica de adição sucessiva.

O imunossensor testado é considerado específico devido aos testes realizados com controle negativo que demonstrou a especificidade para citocina TNF- $\alpha$ . Ressalta-se ainda que ao testar IL-1 e IL-6 comparando-se ao TNF- $\alpha$  pela técnica da adição sucessiva e sinal por EIS, pode-se sugerir que ao converter,

num futuro, esse imunossensor à apresentação de eletrodo impresso, por exemplo, a detecção poderá ser de boa resolubilidade.

O desenvolvimento do imunossensor realizado neste trabalho reforça ainda que, com materiais simples, pode-se colocar no mercado imunossensor de baixo custo que apresente as características comprovadas pelos resultados obtidos.

Portanto, devido à alta demanda para testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade, e especificidade aliado aos resultados obtidos nesse estudo pode-se dar o primeiro passo para uma possível miniaturização do sistema.

Em apresentação portátil poderá ser aplicado na prática médica de diagnóstico e monitoramento de TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como as doenças autoimunes, que necessitam utilizar terapias de acordo com sua condição clínica extremamente variável e assim, promover maior racionalidade de tratamento terapêutico e reduzir maiores complicações e reações adversas pelo uso indiscriminado de imunobiológicos.

## Referências

- Abreu, M. M.; Ciconelli, R. Abordagem medicamentosa da artrite reumatóide. **Revista Sinopse de Reumatologia**, v. 7, n. 2, p. 54-58, jun. 2005.
- Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.745-756. 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1184>
- Andreescu, S.; Noguier, T.; Magearu, V.; Marty, J. L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. **Talanta**, v. 57 (1), p. 169-176, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00017-6)
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Distrito Federal: DOU, 2003.
- Arslan, G.; Ozmen, M.; Gunduz, B.; Zhang, X.; Ersoz, M. Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. **Turk J Chem**, v. 30, p. 203-210. 2006.
- Balkenhohl, T.; Lisdat, F., Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 50–57. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.041>
- Bandiera, L.; Cellere, G.; Cagnin, S.; Toni, A.; Zanoni, E.; Lanfranchi, G.; Lorenzelli, L. A fully electronic sensor for the measurement of cDNA hybridization kinetics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2108-2114. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.025>
- Bertolo, M. B. Como diagnosticar e tratar artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, n. 12, p. 64-72, nov. 2008.
- Billah, M. M.; Hays, H. C. W.; Hodges, C. S.; Ponnambalam, S.; Vohra, R.; Millner, P. A. Mixed self-assembled monolayer (mSAM) based impedimetric immunosensors for cardiac troponin I (cTnI) and soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1). **Sensors and Actuators B**, v. 173 p. 361– 366. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.017>
- Bobbio-Pallavicini, F.; Alpini, C.; Caporali, R.; Avalue, S.; Bugatti, S.; Montecucco, C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. **Arthritis Res Ther**. V. 6 (3); R264-R272. 2004. <http://dx.doi.org/10.1186%2Far1173>

- Bradley, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J. Pathol.** 214, 149–160. 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2287>
- Brahim, S.; Wilson, A. M.; Narinesingh, D.; Iwuoha, E.; Guiseppi-Elie, A. Chemical and Biological Sensors Based on Electrochemical Detection Using Conducting Electroactive Polymers. **Microchimica Acta**, v. 143(2-3): p. 123-137, 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-003-0065-6>
- Braun, J.; Sieper, J. Biological therapies in the spondyloarthritides - the current state. **Rheumatology**; v. 43: p. 1072-1084, 2004. <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keh205>
- Calil, S. S.; Silva, P. R. Q. da; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Acesso em <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>, dia 23 de junho de 2014.
- Campanella, L.; Attioli, R.; Colapicchioni, C.; Tomassetti, M. New amperometric and potentiometric immunosensors for anti-human immunoglobulin G determinations. **Sensors and Actuators B**, v. 55, p. 23 – 32. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00035-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00035-0)
- Carvalho Junior, F. F.; Suehiro, R. M.; Golmia, R.; Scheinberg, M. Agentes biológicos na artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 1/2, p. 20-27, 2009.
- Carvalho, R. M. de; Rath, S.; Kubota, L. T. SPR - Uma Nova Ferramenta para Biossensores. **Química Nova**, v. 26, no. 1, p. 97-104, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100017>
- Castro, T. C. M.; Vieira, W. P.; Duarte, Â. P. Atualização de fármacos utilizados em reumatologia. **Sinopse**, v. 6, n. 3, p. 35-37, 2005.
- Castro-López, V.; Elizalde, J.; Pácek, M.; Hijona, E.; Bujanda, L. A simple and portable device for the quantification of TNF- $\alpha$  in human plasma by means of on-chip magnetic bead-based proximity ligation assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p.499–505, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.039>
- Cattaruzza, F.; Cricenti, A.; Flamini, A.; Girasole, M.; Longo, G.; Prospero, T.; Andreano, G.; Cellai, L.; Chirivino, E. Controlled loading of oligodeoxyribonucleotide monolayers onto unoxidized crystalline silicon; fluorescence-based determination of the surface coverage and of the hybridization efficiency; parallel imaging of the process by Atomic Force Microscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 4, 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gnj034>
- Chamberland, D. L.; Agarwal, A.; Kotov, N.; Fowlkes, J. B.; Carson, P. L.; Wang, X. Photoacoustic tomography of joints aided by an Etanercept-conjugated gold nanoparticle contrast agent—an ex vivo preliminary rat study. **Nanotechnology**, v.19, 095101, p.1-7. 2008. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/19/9/095101>
- Chambers, J. P.; Arulanandam, B. P.; Matta, L. L.; Weis, A.; Valdes, J. J. Biosensor Recognition Elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.10, p.1-12, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525101>
- Chung, J.W.; Bernhardt, R.; Pyun, J.C. Additive assay cancer marker CA 19-9 by SPR biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.118, p.28-32. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.015>
- Ciconelli, R. M. Artrite reumatóide – tratamento. **Sinopse**, v. 3, n. 2, p. 1-17, jun. 2005.
- Corcoran, A. E. Barrett, K.; Turner, M.; Brown, A.; Kissonerghis, A.; Gadnell, M.; Gray, P. W.; Chernajovsky, Y.; Feldmann, M. Characterization of ligand binding by the human p55 tumour-necrosis-factor receptor. Involvement of individual cysteine -rich repeats. **Eur. J. Biochem.**, v.223, p.831-840, 1994. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19059.x>
- Cravo, A. R.; Tavares, V.; Silva, J. C. da. Terapêutica Anti-TNF alfa na Espondilite Anquilosante. **Acta Med Port**, v. 19: p. 141-150, 2006.
- Cruvinel; W. M.; Mesquita Junior, D.; Araújo, J. A. P. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2008.
- Cui, Z.; Wu, D.; Zhang, Y.; Ma, H.; Li, H.; Dua, B.; Wei, Q.; Ju, H. Ultrasensitive electrochemical immunosensors for multiplexed determination using mesoporous platinum nanoparticles as

- nonenzymatic labels. **Analytica Chimica Acta**, v. 807, p. 44–50. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.025>
- Díaz, A. N.; Peinado, M. C. R. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorometric analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 38, p. 426-431, 1997. [http://dx.doi.org/S0925-4005\(97\)00025-7](http://dx.doi.org/S0925-4005(97)00025-7)
- Dong, H.; Li, C. M.; Zhou, Q.; Sun, J. B.; Miao, J. M. Sensitive electrochemical enzyme immunoassay microdevice based on architecture of dual ring electrodes with a sensing cavity chamber. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 624-626. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.034>
- El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M.A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. **Nano Lett.**, v.5, n.5, p.829-834. 2005. <http://dx.doi.org/10.1021/nl050074e>
- Faleiro, L. R.; Araújo, L. H. R.; Varavallo, M. A. A Terapia Anti-TNF- $\alpha$  na Artrite Reumatóide. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 77-94, jan./jun. 2011. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n1p77>
- Feldmann, M.; Maini, R.N. TNF defined as a therapeutic target for reumathoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nature Medicine**, v. 9, n. 10, p.1245-1250, oct. 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/nm939>
- Ferreira, A. A. P.; Yamanaka, H.; Benedetti, A. V. Modificação e Caracterização de SPE com SAMs de Cistamina e Glutaraldeído para Imobilização da Proteína Tc85 de *T. Cruzi*. **IBERSENSOR 2008**. 6 Congresso Iberoamericano de Sensores, v.IB08-11, p. 150-153, 2008.
- Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J. R.; Smolen, J. S.; Burmester, G. R.; Bijlsma, J. W. J.; Dougados, M.; Emery, P.; Keystone, E. C.; Klareskog, L.; Mease, P. J. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor alfa (TNF alfa) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64 Suppl 4, p. iv2 - iv14, 2005. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2005.044941>
- Gau, V.; Ma, S-C.; Wang, H.; Tsukuda, J.; Kibler, J.; Haake, D. A. Electrochemical Molecular Analysis Without Nucleic Acid Amplification. **Methods**, v. 37, n.1, p.73-83. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.008>
- Gil, E. S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I.; Alguns Aspectos de Imunoensaios Aplicados À Química Analítica. **Química Nova**, v. 22, p. 874 – 881. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000600015>
- Gil, E. S.; Melo, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375-391, 2010. <http://dx.doi.org/10.159-S1984-82502010000300002>
- Goldschmidt, M. C. B.; Zaniboni, M. C.; Provenza, J. R.; Arruda, L. Erupção liquenóide: secundária ao uso de adalimumabe? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 2, p. 25-30, Mar./Apr. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042008000200012>
- Gong, J. L.; Liang, Y.; Huang, Y.; Chen, J. W.; Jiang, J. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1501–1507. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.004>
- Gopinath, S. C. B.; Tang, T-H.; Citartan, M.; Chen, Y.; LakshmiPriya, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>
- Hays, H. C. W.; Millner, P. A.; Prodromidis, M. I. Development of capacitance based immunosensors on mixed self-assembled monolayers. **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 1064–1070. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.039>
- IBL. IBL International. **Instruções de Utilização do KIT TNF – alfa ELISA**. Hamburgo, Alemanha, 2012.

- Idriss, H.T., Naismith, J.H. TNF and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microsc. Res. Tech.** 50, 184–195. 2000. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3%3C184::AID-JEMT2%3E3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3%3C184::AID-JEMT2%3E3.0.CO;2-H)
- JOHNSON & JOHNSON MEDICAL LIMITED. Mary Breda Cullen. Prediction and detection of wound infection. G01N 33/543, A61L 15/38, G01N 33/52. WO 2004/086043 A1. 26 mar. 2003, 07 oct. 2004. World Intellectual Property Organization. International Bureau. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT).
- Joshi, M.; Kale, N.; Lal, R.; Ramgopal, R. V.; Mukherji, S. A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomolecules in Bio-MEMS. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2429–2435. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.045>
- Keller, C.; Webb, A.; Davis, J. Cytokines in the seronegative spondyloarthropathies and their modification by TNF blockade: brief report and literature review. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 1128–1132, 2003. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.011023>
- Klimiuk, P. A.; Sierakowski, S.; Latosiewicz, R.; Cylwik, B.; Skowronski, J.; Chwiecko, J. Serum cytokines in different histological variants of reumathoid arthritis. **J. Reumathol.**, v.28, n.6, p.1211-1217. 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11409111>
- Kongsuphol, P.; Ng, H. H.; Pursey, J. P.; Arya, S. K.; Wong, C. C.; Stulz, E.; Park, M. K. EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- $\alpha$  from non-diluted Human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 274-279. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.017>
- Kronqvist, N.; Löfblom, J.; Jonsson, A.; Wernérus, H.; Ståhl, S. A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. **Protein Engineering, Design & Selection**, v.21, n.4, p. 247-255. 2008. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzm090>
- Lazcka, O.; Del Campo, F.J.; Muñoz, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1205-1217. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.358, p.903–911. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06075-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06075-5)
- Li, Y. G.; Zhou, Y. X.; Feng, J. L.; Jiang, Z. H.; Ma, L. R. Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p.277-282, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00767-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00767-3)
- Lima, M. B. **Desenvolvimento de Imunossensor para detecção de fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )**. 2008. 109 fl. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2008.
- Lima, S. M. A. L.; Giorgi, R. D. P. N. Agentes biológicos: principais indicações em reumatologia. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 3, p. 81-86, jun. 2008.
- Liu, Y.; Zhang, W.; Yu, X.; Zhang, H.; Zhao, R.; Shangguan, D.; Li, Y.; Shen, B.; Liu, G. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between human TNF- $\alpha$  and monoclonal antibodies. **Sensors and Actuators B**, v. 99, p. 416–424. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.snb.2003.12.010>
- Liu, C.; Batliwalla, F.; Li, W.; Lee, A.; Roubenoff, R.; Beckman, E.; Khalili, H.; Damle, A.; Kern, M.; Furie, R.; Dupuis, J.; Plenge, R. M.; Coenen, M. J. H.; Behrens, T. W.; Carulli, J. P.; Gregersen, P. K. Genome-Wide Association Scan Identifies Candidate Polymorphisms Associated with Differential Response to Anti-TNF Treatment in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 575-581, Sep. 2008. <http://dx.doi.org/10.2119/2008-00056.Liu>
- Liu, Y., Kwa, T., Revzin, A. Simultaneous detection of cell-secreted TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  using micropatterned aptamer-modified electrodes. **Biomaterials** 33, 7347 - 7355. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.089>

- Liu, Y., Zhou, Q., Revzin, A. An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood. **Analyst** **138**, 4321–4326. 2013. <http://dx.doi.org/10.1039/C3AN00818E>
- Machold, K. P.; Nell, V. P. K.; Stamm, T. A.; Smolen, J. S. Aspects of early arthritis. Traditional DMARD therapy: is it sufficient? **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 3, p. 51-56, 2006. <http://dx.doi.org/10.1186/ar1966>
- Makaraviciute, A.; Ramanaviciene, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460–471. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.060>
- Mantzila, A. G; Prodromidis, M. I. Performance of Impedimetric Biosensors Based on Anodically Formed Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 20, p. 1878-1885, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200503306>
- Marques, P. R. B. O.; Yamanaka, H. Biossensores Baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700034>
- Martin, P.; Medeiros, A. C.; Schainberg, C. G. Inibidores do fator de necrose tumoral no tratamento da artrite idiopática juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 2, p. 17-29, mar./abr. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042006000200007>
- Martins, E. P.; Andrade, L. E. C. Formação de auto-anticorpos após terapia anti-TNF- $\alpha$ . **Sinopse**, v. 7, n. 1, p. 2-6, 2005.
- Martins, T. D.; Ribeiro, A. C. C.; Camargo, H. S.; Filho, P. A. C.; Cavalcante, H. P. M.; Dias, D. L. New Insights on Optical Biosensors: Techniques, Construction and Application. **INTECH**. State of the Art in Biosensors - General Aspects-ch. 5, p. 111-140. 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/52330>
- Melo, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 104 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.
- Mendes, R. K. Desenvolvimento de Biossensor para detecção precoce da ferrugem asiática da soja. Relatório de Atividades. FAPESP. São Paulo, 2008. Trabalho não publicado.
- Miyachi, H. Ikebukuro, K.; Yano, K.; Aburatani, H.; Karube, I. Single nucleotide polymorphism typing on DNA array with hydrophobic surface fabricated by plasma-polymerization technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p.184-189. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.02.022>
- Mohammed, M. I.; Desmulliez, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 4, p. 569-595, 2011. <http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00204f>
- Montecucco, F.; Steffens, S.; Burger, F.; Costa, A. da; Bianchi, G.; Bertolotto, M.; Mach, F.; Dallegri, F.; Ottonello, L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cellular Signalling**, v.20, p. 557–568. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.11.008>
- Moreno, C. R.; Vázquez, P. L.; Parrondo, C. D.; Herrero, F. T.; Lado, F. L; González, M. V. Lugar en terapéutica de los medicamentos antagonistas del factor de necrosis tumoral. (2<sup>a</sup> de dos partes): de los efectos indeseados y recomendaciones. **Anales de Medicina Interna**, v. 23, n. 2, p. 86-92, 2006. <http://dx.doi.org/10.4321/S0212-71992006000200009>
- Moreno-Guzmán, M.; Ojeda, I; Villalonga, R.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 82–86. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.01>
- Morgan, C. L.; Newman, D. J.; Price, C. P.; Immunosenors: technology and opportunities in laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 193-209, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8595711>

- Navrátilová, I.; Skládal, P.; Viklický, V. Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria. **Talanta**, v. 55, p. 831–839. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00512-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00512-4)
- Nunes, G. S.; Jeanty, G.; Marty, J-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 107-115, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.100>
- Oliveira, J. E.; Consolin-Filho, N.; Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C.; Medeiros, E. S. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8, n.1, p. 1–11, 2013.
- Pfeffer, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p.185-191, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787558>
- Prieto-Simón, B.; Bandaru, N.M.; Saint, C.; Voelcker, N.H. Tailored carbon nanotube immunosensors for the detection of microbial contamination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 642–648. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.089>
- Pui, T. S., Kongsuphol, P., Arya, S. K., Bansal, T. Detection of tumor necrosis factor (TNF) in cell culture medium with label free electrochemical impedance spectroscopy. **Sensors and Actuators B** **181**. 494– 500. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.019>
- Retama, J. R.; López, M. S.; Pérez, J. P. H.; Cabanillas, G. F.; López Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. Biosensors based on acrylic microgels: A comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 11, p. 2268-2275, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.011>
- Riccardi, C. S.; Costa, P. I.; Yamanaka, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200020>
- Ricci, F.; Adornetto, G.; Palleschi, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>
- Rossol, M.; Kaltenhäuser, S.; Scholz, R.; Häntzschel, H.; Hauschildt, S.; Wagner, U. The contact-mediated response of peripheral-blood monocytes to preactivated T cells is suppressed by serum factors in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n.6, p. 189-199. 2005. <http://dx.doi.org/10.1186/2Far1804>
- Russo, R. A. G.; Katsicas, M. M. Recaídas de la artritis crónica juvenil luego de la suspensión de etanercept. **Archivos argentines de pediatría**, v. 102, n. 1, p. 44-48, Jan. 2005.
- Sadik, O. A.; Ngundi, M.; Wanekaya, A. Chemical Biological Sensors Based on Advances in Conducting Electroactive Polymers. **Microchimica Acta**, v. 143(2-3), p. 187-194, 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-003-0057-6>
- Sánchez-Pernaute, O.; Ospelt, C.; Neidhart, M.; Gay, S. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v.30, p.12-20. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2007.11.006>
- Sargent, A.; Loi, T.; Gal, S.; Sadik, O. A. The electrochemistry of antibody modified conducting polymer electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 470(2), p. 144-156, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00231-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00231-4)
- Sergeyeva, T. A.; Lavrik, N. V.; Piletsky, S. A.; Rachkov, A. E.; El'skaya, A. V. Polyaniline label-based conductometric sensor for IgG detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 34(1–3), p. 283-288, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)80006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80006-8)
- Shankaran, D. R; Gobi, K.V.; Miura, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 121, p. 158–177. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.014>
- Shrivastava, A. K.; Singh, H. V.; Raizada, A.; Singh, S. K.; Pandey, A.; Singh, N.; Yadav, D. S.; Sharma, H. Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 42, n. 2, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2013.11.003>

- Silva, R. G.; Vannucci, A. B.; Latorre, L. C.; Zerbini, C. A. F. Como diagnosticar e tratar artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p 554-576, 2003.
- Sociedad Chilena de Reumatologia. Tratamiento com agentes biológicos de los pacientes con artritis reumatóide refractaria a tratamiento tradicional. **Revista Chilena de Reumatologia**, v. 24, n 3, p. 121-132, 2008.
- Sokolov, K. Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan, R.; Richards-Kortum, R. Real Time Vital Optical Imaging of Pre cancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles. **Cancer Research**, v. 63, p. 1999-2004. 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727808>
- Song, S.; Xu, H.; Fan, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p. 433-440, 2006. <http://dx.doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.433>
- Tobón, G. J.; Youinou, P.; Saraux, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 35, n. 1, p. 10-4, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2009.12.009>
- Ukaji, E. Furusawa, T.; Sato M.; Suzuki N. The effect of surface modification with silane coupling agent on suppressing the photo-catalytic activity of fine TiO<sub>2</sub> particles as inorganic UV filter. **Applied Surface Science**, v. 254, p. 563-569. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.06.061>
- Vidal, J. C.; Esteban, S.; Gil, J.; Castillo, J. R. A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. **Talanta**, v. 68, p. 791-799, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.038>
- Viticoli, M.; Curulli, A.; Cusma, A.; Kaciulis, S.; Nunziante, S.; Pandolfi, L.; Valentini, F.; Padeletti, G. Third-generation biosensors based on TiO<sub>2</sub> nanostructured films. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, p. 947-951. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2005.09.080>
- Wang, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1887-1892. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027>
- Wang, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.16, p.3011-3016. 2000. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.16.3011>
- Yang, X.; Zhou, Z.; Xiao, D.; Choi, M. M. F. A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, p.1613-1620. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2005.08.004>
- Yang, Y.; Yang, M.; Wang, H.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 102, p. 162-168, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.016>

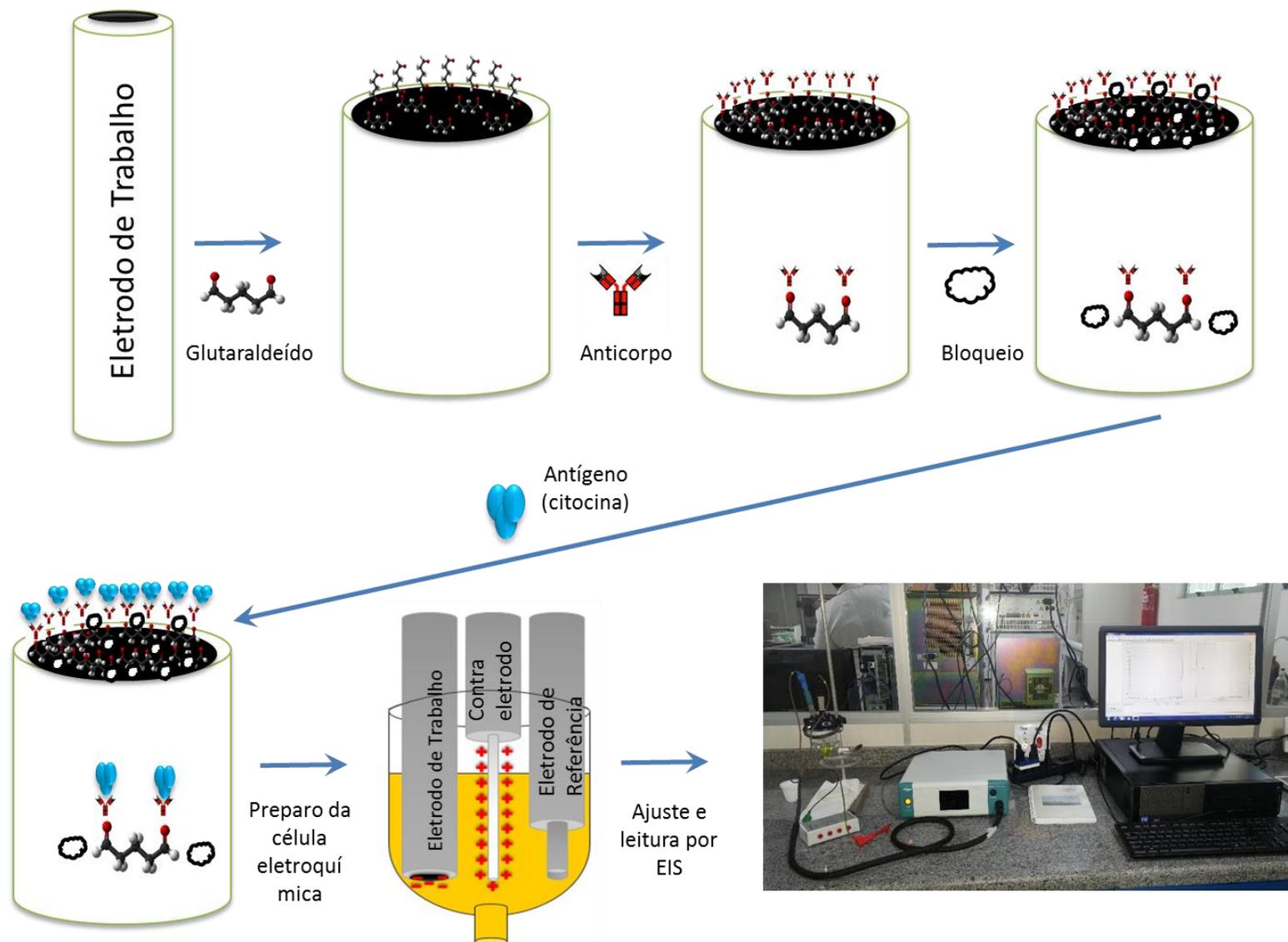


Figura 1. Etapas de produção de monocamada, imobilização de anticorpo, adição de bloqueio, adição de antígeno (citocina) por adição sob a monocamada e leitura por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

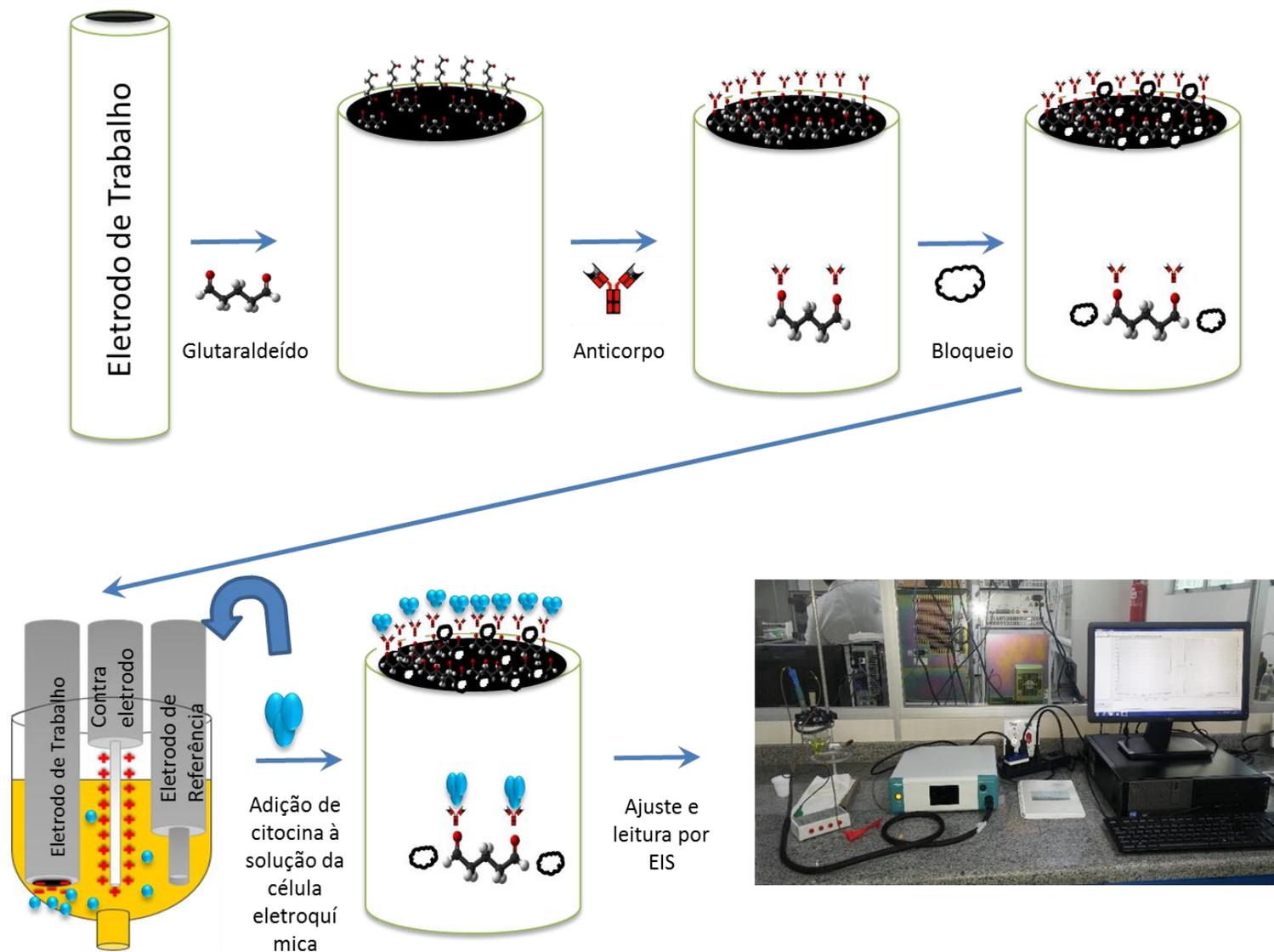
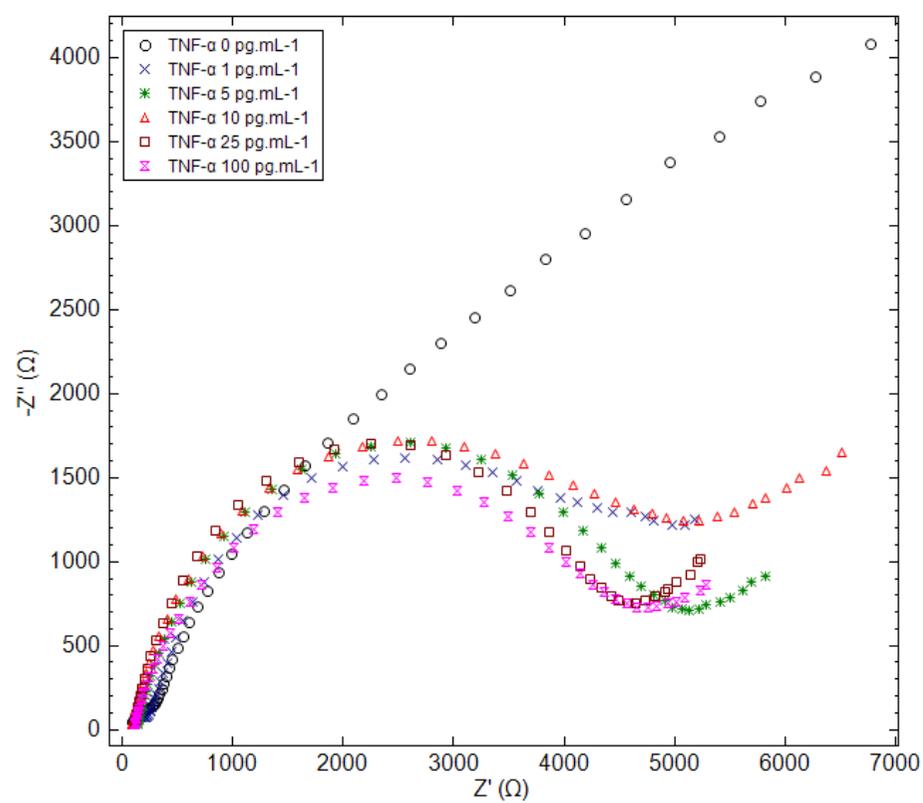
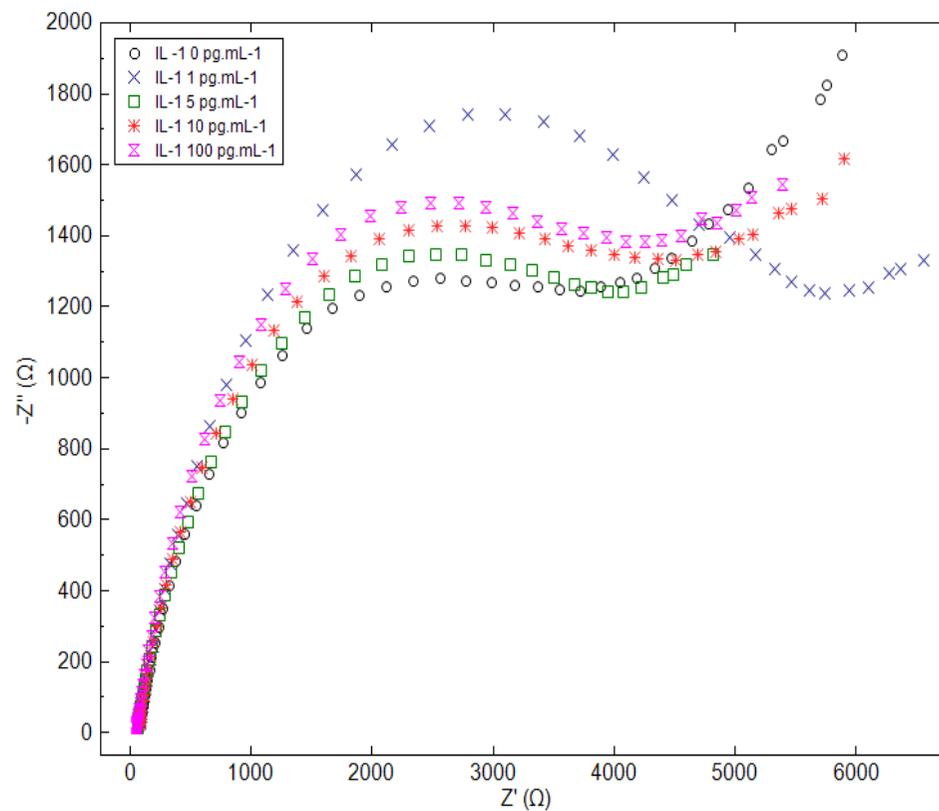


Figura 2. Etapas de produção de monocamada, imobilização de anticorpo, adição de bloqueio, adição de antígeno (citocina) de forma sucessiva na solução da célula eletroquímica e leitura por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

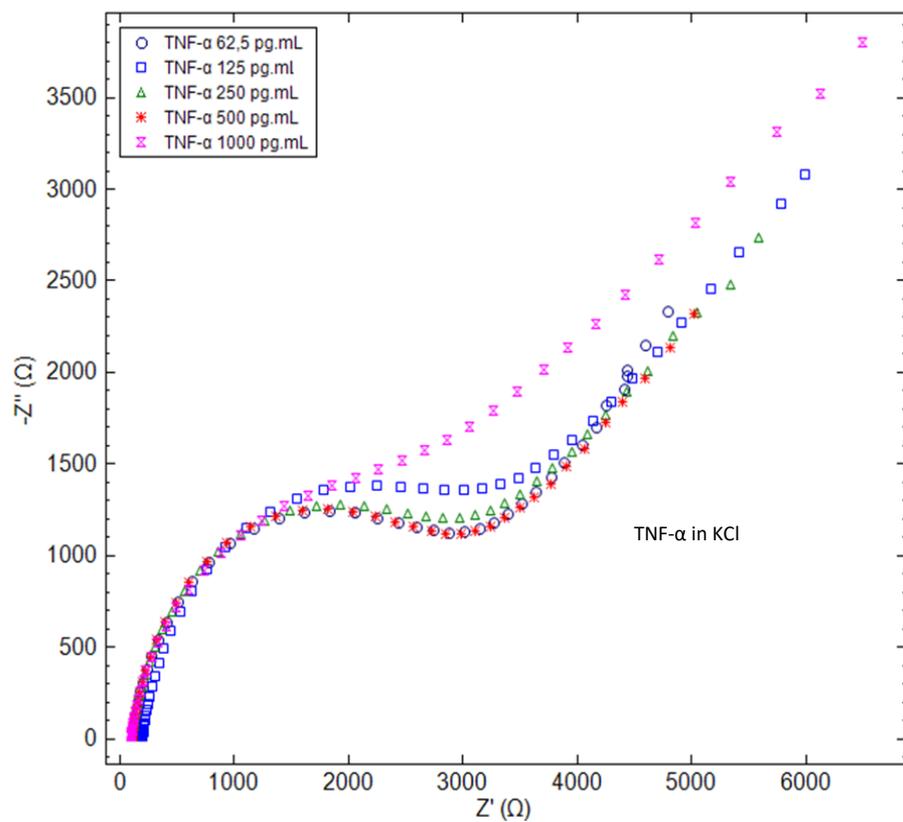


(a)

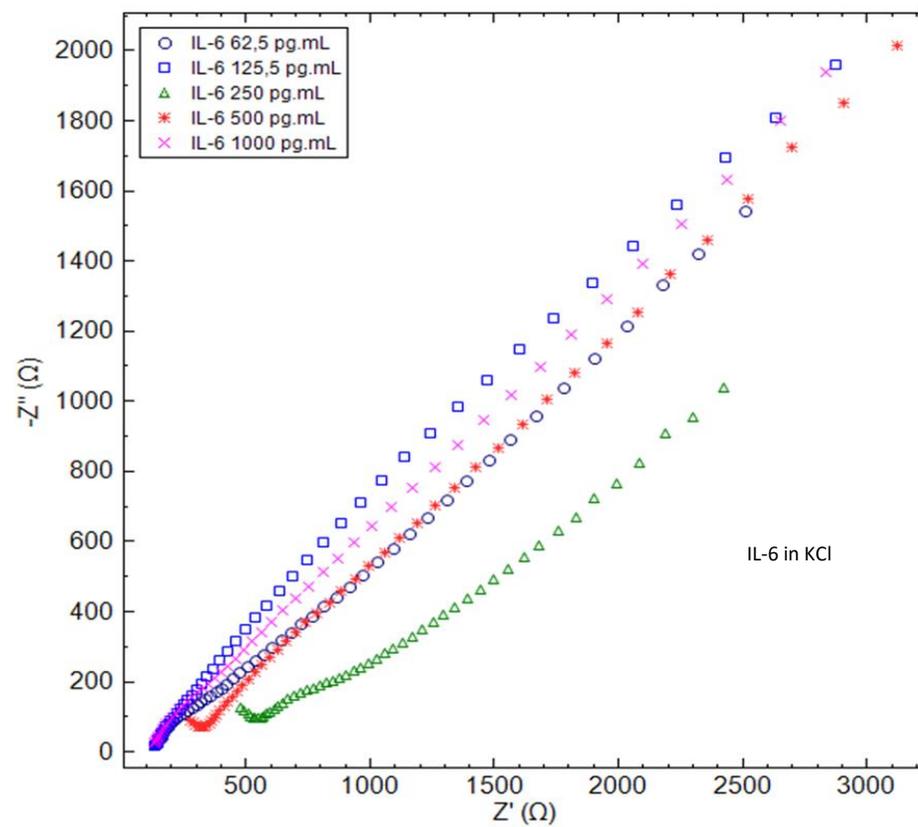


(b)

Figura 3. Gráficos de Nyquist para eletrodos de interação antígeno – anticorpo nas concentrações de  $1\text{pg.mL}^{-1}$ ,  $5\text{pg.mL}^{-1}$ ,  $10\text{pg.mL}^{-1}$ ,  $25\text{pg.mL}^{-1}$ ,  $100\text{pg.mL}^{-1}$ . (a) Eletrodo interação TNF- $\alpha$  e Infleximabe. (b) Eletrodo interação IL-1 e Infleximabe como controle negativo.



(a)



(b) IL-6 in KCl

Figura 4. Gráficos de Nyquist para eletrodos de interação antígeno – anticorpo nas concentrações de  $62,5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ,  $125 \text{ pg.mL}^{-1}$ ,  $250 \text{ pg.mL}^{-1}$ ,  $500 \text{ pg.mL}^{-1}$ ,  $1000 \text{ pg.mL}^{-1}$ . (a) Eletrodo interação TNF- $\alpha$  e Infleximabe. (b) Eletrodo interação IL-6 e Infleximabe.

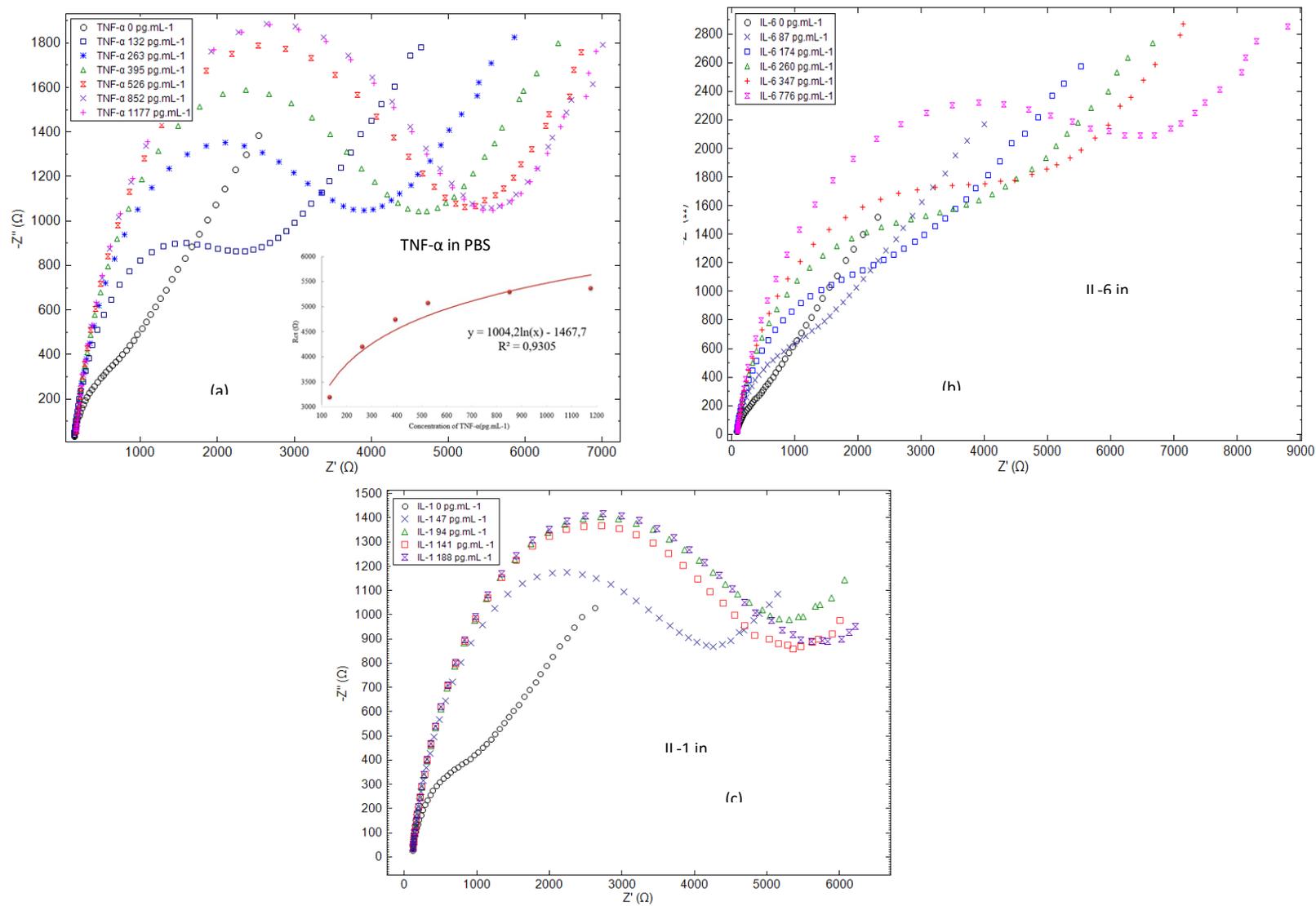


Figura 5. Gráficos de Nyquist para eletrodos de interação antígeno – anticorpo por adições sucessivas. (a) Eletrodo interação TNF- $\alpha$  e Infiximabe. (b) Eletrodo interação IL-6 e Infiximabe. (c) Eletrodo interação IL-1 e Infiximabe.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há relevância para o desenvolvimento de testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade e especificidade para quantificação de marcadores moleculares, como citocinas, no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como doenças autoimunes, as quais são tratadas com várias modalidades terapêuticas, de acordo com as condições clínicas dos pacientes, que são extremamente variáveis.

A concepção de um imunossensor portátil, de fácil utilização, de alta sensibilidade e especificidade, contribuirá para direcionar um tratamento mais eficaz das doenças autoimunes, nas quais são utilizadas terapias com anticorpos monoclonais direcionados para citocinas inflamatórias. Além do alto custo desses imunobiológicos, que são fornecidos pelo Ministério da Saúde, a administração de doses inadequadas torna o paciente imunossuprimido, sujeito a infecções e a outras patologias graves, durante o tratamento.

O imunossensor testado é considerado específico devido aos testes realizados com controle negativo que demonstrou a especificidade para citocina TNF- $\alpha$ . Ressalta-se ainda que ao testar IL-1 e IL-6 comparando-se ao TNF- $\alpha$  pela técnica da adição sucessiva e sinal por EIS, pode-se sugerir que ao converter, num futuro, esse imunossensor à apresentação de eletrodo impresso, por exemplo, a detecção poderá ser de boa resolubilidade.

O desenvolvimento do imunossensor realizado neste trabalho reforça ainda que, com materiais simples, pode-se colocar no mercado imunossensor de baixo custo que apresente as características comprovadas pelos resultados obtidos.

Portanto, devido à alta demanda para testes rápidos, quantitativos, com alta sensibilidade, e especificidade aliado aos resultados obtidos nesse estudo pode-se dar o primeiro passo para uma possível miniaturização do sistema.

Em apresentação portátil poderá ser aplicado na prática médica de diagnóstico e monitoramento de TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes portadores de enfermidades crônicas, como as doenças autoimunes, que necessitam utilizar terapias de acordo com sua condição clínica extremamente variável e assim, promover maior racionalidade de tratamento terapêutico e reduzir maiores complicações e reações adversas pelo uso indiscriminado de imunobiológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. M.; CICONELLI, R. Abordagem medicamentosa da artrite reumatóide. **Revista Sinopse de Reumatologia**, v. 7, n. 2, p. 54-58, jun. 2005.

ANDREESCU, S.; NOGUER, T.; MAGEARU, V.; MARTY, J. L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. **Talanta**, v. 57 (1), p. 169-176, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bula do CIMZIA<sup>®</sup> (Certolizumabe), AstraZeneca. Aprovado em 03 abril 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Distrito Federal: DOU, 2003.

BERTOLO, M. B. Como diagnosticar e tratar artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, n. 12, p. 64-72, nov. 2008.

BRAHIM, S.; WILSON, A. M.; NARINESINGH, D.; IWUOHA, E.; GUISEPPI-ELIE, A. Chemical and Biological Sensors Based on Electrochemical Detection Using Conducting Electroactive Polymers. **Microchimica Acta**, v. 143(2-3): p. 123-137, 2003. doi: 10.1007/s00604-003-0065-6

BRAUN, J.; SIEPER, J. Biological therapies in the spondyloarthritis - the current state. **Rheumatology**; v. 43: p. 1072-1084, 2004. doi:10.1093/rheumatology/keh205

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. da; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Acesso em <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>, dia 23 de junho de 2014.

CARVALHO JUNIOR, F. F.; SUEHIRO, R. M.; GOLMIA, R.; SCHEINBERG, M. Agentes biológicos na artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 1/2, p. 20-27, 2009.

CARVALHO, R. M. de; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma Nova Ferramenta para Biossensores. **Química Nova**, v. 26, no. 1, p. 97-104, 2003.

CASTRO-LÓPEZ, V.; ELIZALDE, J.; PACEK, M.; HIJONA, E.; BUJANDA, L. A simple and portable device for the quantification of TNF- $\alpha$  in human plasma by means of on-chipmagnetic bead-based proximity ligation assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p.499–505, 2014. doi: 10.1016/j.bios.2013.10.039

CASTRO, T. C. M.; VIEIRA, W. P.; DUARTE, Â. P. Atualização de fármacos utilizados em reumatologia. **Sinopse**, v. 6, n. 3, p. 35-37, 2005.

CENTOCOR ORTO BIOTECH INC. Injeção de SIMPONI melhora a inflamação, danos estruturais em doentes com artrite reumatoide. Publicado em 09 de nov. De 2010. Disponível em: <[www.news-medical.net/news/20101109/5039/Portuguese.aspx](http://www.news-medical.net/news/20101109/5039/Portuguese.aspx)> Acesso em 27 out. 2016.

CHAMBERS, J. P; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L.; WEIS, A.; VALDES, J. J. Biosensor Recognition Elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.10, p.1-12, 2008.

CHUNG, J.W.; BERNHARDT, R.; PYUN, J.C. Additive assay cancer marker CA 19-9 by SPR biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.118, p.28-32. 2006. doi:10.1016/j.snb.2006.04.015

CICONELLI, R. M. Artrite reumatóide – tratamento. **Sinopse**, v. 3, n. 2, p. 1-17, jun. 2005.

CRAVO, A. R.; TAVARES, V.; SILVA, J. C. da. Terapêutica Anti-TNF alfa na Espondilite Anquilosante. **Acta Med Port**, v. 19: p. 141-150, 2006.

CRUVINEL; W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2008.

DIAZ, A. N.; PEINADO, M. C. R. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorometric analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 38, p. 426-431, 1997.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Modificação e Caracterização de SPE com SAMs de Cistamina e Glutaraldeído para Imobilização da Proteína Tc85 de T.

*Cruzi*. **IBERSENSOR 2008**. 6 Congresso Iberoamericano de Sensores, v.IB08-11, p. 150-153, 2008.

FURST, D.E., BREEDVELD, F.C., KALDEN, J. R.; SMOLEN, J. S.; BURMESTER, G. R.; BIJLSMA, J. W. J.; DOUGADOS, M.; EMERY, P.; KEYSTONE, E. C.; KLARESKOG, L.; MEASE, P. J. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor alfa (TNF alfa) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64 Suppl 4, p. iv2 - iv14, 2005. doi: 10.1136/ard.2005.044941

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I.; Alguns Aspectos de Imunoensaios Aplicados À Química Analítica. **Química Nova**, v. 22, p. 874 - 881, 1999. doi: 10.1590/S0100-40421999000600015

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375-391, 2010. doi: 10.159-S1984-82502010000300002

GOLDSCHMIDT, M. C. B.; ZANIBONI, M. C.; PROVENZA, J. R.; ARRUDA, L. Erupção liquenóide: secundária ao uso de adalimumabe? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 2, p. 25-30, Mar./Apr. 2008.

GONG, J. L.; LIANG, Y.; HUANG, Y.; CHEN, J. W.; JIANG, J. H.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p.1501–1507, 2007. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.004

IBL. IBL International. **Instruções de Utilização do KIT TNF – alfa ELISA**. Hamburgo, Alemanha, 2012.

KELLER, C.; WEBB, A.; DAVIS, J. Cytokines in the seronegative spondyloarthropaties and their modification by TNF blockade: brief report and literature review. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 1128—1132, 2003. doi: 10.1136/ard.2003.011023

KONGSUPHOL, P.; NG, H. H.; PURSEY, J. P.; ARYA, S. K.; WONG, C. C.; STULZ, E.; PARK, M. K. EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- $\alpha$  from non-diluted

Human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 274-279, 2014. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.017

LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F.J.; MUÑOZ, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1205-1217, 2007. doi: 10.1016/j.bios.2006.06.036

LI, Y. G.; ZHOU, Y. X.; FENG, J. L.; JIANG, Z. H.; MA, L. R. Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p.277-282, 1999. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00767-3

LIMA, M. B. **Desenvolvimento de Imunossensor para detecção de fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa)**. 2008. 109 fl. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2008.

LIMA, S. M. A. L.; GIORGI, R. D. P. N. Agentes biológicos: principais indicações em reumatologia. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 3, p. 81-86, jun. 2008.

LIU, C.; BATLIWALLA, F.; LI, W.; LEE, A.; ROUBENOFF, R.; BECKMAN, E.; KHALILI, H.; DAMLE, A.; KERN, M.; FURIE, R.; DUPUIS, J.; PLENGE, R. M.; COENEN, M. J. H.; BEHRENS, T. W.; CARULLI, J. P.; GREGERSEN, P. K. Genome-Wide Association Scan Identifies Candidate Polymorphisms Associated with Differential Response to Anti-TNF Treatment in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 575-581, Sep. 2008.

MACHOLD, K. P.; NELL, V. P. K.; STAMM, T. A.; SMOLEN, J. S. Aspects of early arthritis. Traditional DMARD therapy: is it sufficient? **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 3, p. 51-56, 2006. doi: 10.1186/ar1966

MANTZILA, A. G; PRODROMIDIS, M. I. Performance of Impedimetric Biosensors Based on Anodically Formed Ti/TiO<sub>2</sub> Electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n 20, p. 1878-1885, 2005. doi: 10.1002/elan.200503306

MARTIN, P.; MEDEIROS, A. C.; SCHAINBERG, C. G. Inibidores do fator de necrose tumoral no tratamento da artrite idiopática juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 2, p. 17-29, mar./abr. 2006.

MARTINS, E. P.; ANDRADE, L. E. C. Formação de auto-anticorpos após terapia anti-TNF- $\alpha$ . **Sinopse**, v. 7, n. 1, p. 2-6, 2005.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 104 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

MENDES, R. K. Desenvolvimento de Biossensor para detecção precoce da ferrugem asiática da soja. Relatório de Atividades. FAPESP. São Paulo, 2008. Trabalho não publicado.

MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab on a Chip**, v. 11, n 4, p. 569-595, 2011. doi: 10.1039/c0lc00204f

MORENO, C. R.; VÁZQUEZ, P. L.; PARRONDO, C. D.; HERRERO, F. T.; LADO, F. L.; GONZÁLEZ, M. V. Lugar en terapéutica de los medicamentos antagonistas del factor de necrosis tumoral. (2ª de dos partes): de los efectos indeseados y recomendaciones. **Anales de Medicina Interna**, v. 23, n. 2, p. 86-92, 2006. doi: 10.4321/S0212-71992006000200009

MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P.; Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 193-209, 1996.

NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 107-115, 2004. Doi: 10.1016/j.aca.2004.03.100

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8, n.1, p. 1 –11, 2013.

RETAMA, J. R.; LÓPEZ, M. S.; PÉREZ, J. P. H.; CABANILLAS, G. F.; LÓPEZ CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. A comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 11, p. 2268-2275, 2005. Doi: 10.1016/j.bios.2004.10.011

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002. Doi: 10.1590/S0100-40422002000200020

RICCI, F., ADORNETTO, G., PALLESCI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012. Doi: 10.1016/j.electacta.2012.06.033

RUSSO, R. A. G.; KATSICAS, M. M. Recaídas de la artritis crónica juvenil luego de la suspensión de etanercept. **Archivo argentino pediatría**, v. 102, n. 1, p. 44-48, Jan. 2005.

SADIK, O. A.; NGUNDI, M.; WANEKAYA, A. Chemical Biological Sensors Based on Advances in Conducting Electroactive Polymers. **Microchimica Acta**, v. 143(2-3), p. 187-194, 2003. Doi: 10.1007/s00604-003-0057-6

SARGENT, A.; LOI, T.; GAL, S.; SADIK, O. A. The electrochemistry of antibodymodified conducting polymer electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 470(2), p. 144-156, 1999. Doi: 10.1016/S0022-0728(99)00231-4

SERGEYEVA, T. A.; LAVRIK, N. V.; PILETSKY, S. A.; RACHKOV, A. E.; EL'SHAYA, A. V. Polyaniline label-based conductometric sensor for IgG detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 34(1-3), p. 283-288, 1996. Doi: 10.1016/S0925-4005(97)80006-8

SILVA, R. G.; VANNUCCI, A. B.; LATORRE, L. C.; ZERBINI, C. A. F. Como diagnosticar e tratar artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p 554-576, 2003.

SHANKARAN, D. R; GOBI, K.V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 121, p. 158-177, 2007. Doi: 10.1016/j.snb.2006.09.014

SHRIVASTAVA, A. K.; SINGH, H. V.; RAIZADA, A.; SINGH, S. K.; PANDEY, A.; SINGH, N.; YADAV, D. S.; SHARMA, H. Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 42, n. 2, 2014. Doi: 10.1016/j.aller.2013.11.003

SOCIEDAD CHILENA DE REUMATOLOGIA. Tratamiento com agentes biológicos de los pacientes con artritis reumatóide refractaria a tratamiento tradicional. **Revista Chilena de Reumatología**, v. 24, n 3, p. 121-132, 2008.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p. 433-440, 2006. Doi: 10.2147/nano.2006.1.4.433

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 35, n. 1, p. 10-4, 2010. Doi: 10.1016/j.jaut.2009.12.009

VIDAL, J. C.; ESTEBAN, S.; GIL, J.; CASTILLO, J. R. A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. **Talanta**, v. 68, p. 791-799, 2006. Doi: 10.1016/j.talanta.2005.06.038

YANG, Y.; YANG, M.; WANG, H.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 102, p. 162-168, 2004. Doi: 10.1016/j.snb.2004.04.016