



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Piauí – UFPI

- Ponto Focal -

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade Anti-HLA, no contexto do transplante de órgãos sólidos

THALYTA PEREIRA OLIVEIRA

Teresina - PI

2019

THALYTA PEREIRA OLIVEIRA

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade Anti-HLA, no contexto do transplante de órgãos sólidos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia em Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.

Teresina – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

O48d Oliveira, Thalyta Pereira.
Desenvolvimento de biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade Anti-HLA, no contexto do transplante de órgãos sólidos / Thalyta Pereira Oliveira. – 2019.
67 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior”.

1. Transplante Renal. 2. Biossensor. 3. Antígeno.
4. Anticorpo. I. Título.

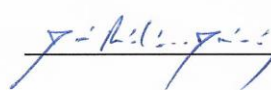




CDD 617.95

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: THALYTA PEREIRA OLIVEIRA

TÍTULO DO PROJETO: “Desenvolvimento de biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade Anti-HLA, no contexto de transplante de órgãos sólidos.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Profa. Dra. Sâmya Danielle Lima de Freitas – UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Everson Thiago Santos Gerônimo da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 21 de março de 2019.

HORÁRIO: 08:00h

LOCAL: Auditório do Departamento de Química - UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico especialmente à minha mãe Maria Daguia, minha irmã Dalila e ao meu esposo Jorge que estiveram comigo nessa caminhada

AGRADECIMENTOS

A Jeová Jiré, Senhor forte que tem me guiado até aqui;

Ao prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior, pela orientação, ensinamentos constantes, ajuda acolhedora ao longo de dez anos, pela experiência fornecida ao longo deste tempo, por me ter facultado as condições necessárias para a realização da graduação, mestrado e doutorado;

A Suely Moura Melo, por todos os momentos que foram possíveis contar com seu amor, palavras e grande ajuda. Obrigada por ter estado presente nesses momentos.

A Natália e Jéssica pela amizade, por tudo aquilo que são e pelo que fazem por mim. Aprendi com vocês coisas que não se aprendem em livros e artigos;

Ao meu amigo Vanildo, pela disposição em todos os momentos que necessitei, pelos conselhos, por toda ajuda que me foi dada;

À minha irmã Rachel, por estar sempre disponível a me ouvir e por estar sempre do meu lado com uma palavra de coragem a dizer para que continuasse a prosseguir;

Ao meu pastor Francisco Carlindo Vieira pelas orações;

À professora Semirames Jamil Hadad do Monte, por proporcionar as condições para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Ao professor Adalberto Socorro, por toda ajuda disponibilizada.

Ao grupo Bioeletroquímica

Ao pessoal do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular;

A Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

O transplante de rins é considerado atualmente a forma de tratamento mais efetiva para a Insuficiência Renal Crônica na fase terminal, possibilitando a melhoria na qualidade de vida e sobrevivência do paciente em longo prazo. Por este fator, a rejeição do alo-enxerto tem sido considerada um fator que tem gerado grande preocupação na terapia de receptores de transplantes renais na busca por medidas de prevenção deste evento. Neste trabalho utilizou-se um eletrodo de ouro, "homemade" que apresentou voltamograma característico de ouro policristalino. Foram imobilizados os linfócitos e testados com soros humanos positivos e negativos e complementos sobre o eletrodo de ouro. Os experimentos foram realizados em uma célula de três eletrodos: trabalho o eletrodo de ouro; referência Ag/AgCl em solução de KCl saturado; contra eletrodo placa de platina. A técnica utilizada foi a técnica eletroquímica, voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos dos linfócitos imobilizados sobre a superfície do ouro apresentou corrente anódica $1,78 \mu\text{A}$ em aproximadamente $0,50 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. As respostas eletroquímicas dos soros (positivo e negativo) e do complemento não apresentam sinais oxidação ou redução no intervalo de potencial medido. Os eletrodos com células e soro positivo apresentou o sinal de corrente amplificado, no potencial de oxidação das células. O eletrodo foi qualitativamente eficiente quando comparado aos métodos de análise citométrica de fluxo e citotoxicidade dependente de complemento, podendo ser utilizado com vantagens operacionais e econômicas.

Palavras-chave: linfócitos; biossensor; antígeno; anticorpo

ABSTRACT

Kidney transplantation is currently considered the most effective form of treatment for chronic renal failure in the terminal phase, making it possible to improve quality of life and long-term survival of the patient. Due to this factor, allograft rejection has been considered a factor that has generated great concern in the therapy of renal transplant recipients in the search for measures to prevent this event. This work reports the development of an electrochemical biosensor for use in genetic compatibility testing among individuals. A "homemade" gold electrode was used, which showed characteristic voltammograms of polycrystalline gold. Lymphocytes were immobilized and tested with positive and negative human serum and complements on the gold electrode. The experiments were carried out in a cell of three electrodes: work electrode - electrode gold; reference electrode - Ag / AgCl in saturated KCl solution; counter electrode - plate platinum. The technique used was cyclic voltammetry. The cyclic voltammograms of immobilized lymphocytes on the gold surface presented 1.78 μA anode current at approximately 0.50 V vs. Ag / AgCl. The electrochemical responses of serums (positive and negative) and complement do not show oxidation or reduction signals in the measured potential range. The electrodes with cells and positive serum showed the amplified current signal in the oxidation potential of the cells. The electrode developed to verify genetic compatibility between individuals, in a qualitative analysis, was effective when compared with the methods of flow cytometric analysis and complement dependent cytotoxicity. The results suggest that the electrochemical biosensor can be used for such an application.

keywords: kidney transplantation, biosensor, blood cells; antigen; antibody

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Principais componentes de um biossensor	25
Figura 2. Classificação dos biossensores	27
Figura 3. Formação do complexo antígeno/anticorpo em diferentes superfícies transdutoras.	36
Figura 4. Principais técnicas de imobilização: (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) encapsulamento e (e) afinidade.....	37

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 5. Potenciostato/Galvanostato para medidas eletroquímicas.....	39
Figura 6. Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos. EA = eletrodo auxiliar; ER = eletrodo de referência; ET = eletrodo de trabalho.....;	40
Figura 7. Microcélula eletroquímica para o eletrodo de trabalho.....	41
Figura 8. Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de Au	42
Figura 9. Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de Au com manta magnetizadas acopladas.....	43
Figura 10. Separação celular por gradiente de densidade	44

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 11. Eletrodo de trabalho limpo eletroquimicamente, varredura de potencial de -0,2 a 1,55 V vs Ag/AgCl, velocidade de varredura a 250 mV s ⁻¹ em solução de H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ , comparação da terceira varredura de quatro eletrodos diferentes	46
Figura 12. Imagem da superfície do eletrodo em microscópio óptico (A) superfície do eletrodo de ouro limpo e (B) células depositadas na superfície do eletrodo de ouro. Magnificação de (A) e (B) a 40x.....	47
Figura 13. (A) Voltamograma ciclico do eletrodo de ouro em solução PBS; (B) eletrodo de ouro com células adsorvidas nos tempos de 15, 30, 45 e 60 min, em solução PBS, velocidade de varredura de 250 mV s ⁻¹ , no intervalo de potencial de - 0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl	49

Figura 14. Voltamogramas da adsorção de células para diluições realizadas com tempo de adsorção de superfície no eletrodo por 15 min. Eletrodo de ouro com células adsorvidas, em solução PBS, velocidade de varredura de 250 mV s ⁻¹ , em intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl...	51
Figura 15. Voltamogramas resultantes (A) amostra – 5 µL de soro controle positivo no eletrodo de trabalho limpo de Au, (B) amostra – 5 µL de soro controle negativo no eletrodo de trabalho limpo de Au, (C) amostra de complemento – 5 µL no eletrodo de trabalho limpo de Au e (D) solução diluída de células (42450 células). 3 varreduras com potencial variando entre -0,2 e 0,75 V, velocidade de varredura de 250 mV s ⁻¹ .	52
Figura 16. Análises voltamétricas das soluções (A) solução de 5 µL de soro controle negativo e complemento sobre o eletrodo de ouro limpo, (B) solução de 5 µL de soro controle positivo e complemento, (C) solução de 5 µL de soro negativo e células, (D) solução de 5 µL de soro positivo e células, (E) solução de 5 µL de células diluídas, soro controle negativo e complemento (5 µL:1 µL: 4 µL) e (F) amostra de 5 µL de células, soro controle positivo e complemento (5 µL:1 µL: 4 µL) sobre o eletrodo de ouro limpo, na faixa de potencial -0,2 a 1,55 V, 3 varreduras a 250 mV s ⁻¹ .	54
Figura 17. Identificação Teste de íons cloreto em amostras de soro humano com solução de nitrato de prata (AgNO ₃ 0.1 mol.L ⁻¹)	55
Figura 18. Imagem da superfície do eletrodo no microscópio óptico (A) superfície do eletrodo de ouro com células e controle positivo do soro (B) superfície do eletrodo de ouro com células e soro controle negativo; ampliação (A) e (B), 40x	56
Figura 19. Voltamogramas cíclicos das amostras de beads magnéticas com anticorpo monoclonal anti- CD19 e anti-CD3 sobre o eletrodo de ouro limpo, na faixa de potencial -0,2 a 0,8V, 3 varreduras a 250mV s ⁻¹	57

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Áreas dos picos de corrente obtidos nos voltamogramas resultantes (Figura 2) em diferentes tempos de adsorção das células sobre a superfície do eletrodo de ouro. Varredura de potencial entre -0,2 e 0,80 V, velocidade de varredura a 250 mV s^{-1}	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HLA	Sistema Antígeno Leucocitário Humano
ABTO	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
IRC	Insuficiência Renal Crônica
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Ag	Antígeno
CF	Citometria de Fluxo
CDC	Citometria Dependente de Complemento
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de Prata (eletrodo de referência)
VC	Voltametria cíclica
E_{Au}	Eletrodo de ouro
$E_{Au+cell}$	Eletrodo de ouro com células depositadas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Transplantes de órgãos sólidos.....	19
3.2 Biossensores	23
3.2.2 Elementos básicos para a construção de um biossensor.....	20
3.3 Classificação dos biossensores com base na transdução do sinal	23
3.3.1 Métodos de detecção eletroquímicos	23
3.3.1.1 Biossensores potenciométricos	25
3.3.1.2 Biossensores amperométricos.....	30
3.3.1.3 Biossensores condutimétricos.....	31
3.3.2 Biossensores ópticos.....	31
3.3.3 Biossensores piezoelétricos	32
3.3.4 Biossensores calorimétricos.....	32
3.4 Classificação com base no elemento de reconhecimento biológico.....	34
3.4.1 Biossensores enzimáticos	34
3.4.2 Biossensores celulares ou microbiológicos	35
3.4.3 Imunobiossensores	36
3.5 Técnicas de imobilização	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Instrumentação eletroquímica e construção do eletrodo de trabalho	39
4.2 Limpeza e condicionamento do eletrodo de trabalho	43
4.3 Protocolo de Separação das células mononucleares.....	43
4.4 Construção do biossensor eletroquímico a partir da deposição de células.....	44
4.5 Obtenção de amostras de soro controle positivo, soro controle negativo e complemento.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de trabalho	46
5.2 Deposição de células sobre a superfície do eletrodo	47

5.3 Estudo do tempo de adsorção de células sobre o eletrodo de trabalho.....	48
5.4 Estudo da concentração de células sobre o eletrodo de trabalho.....	50
5.5 Medidas de voltametrias para as diferentes amostras de Soros, positivo e negativo e para o complemento	51
5.6 Análises de voltametrias para o cruzamento das diferentes amostras.....	53
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	56
Apêndice: Artigo	67
Patente.....	67

1. INTRODUÇÃO

No tratamento da Insuficiência Renal Crônica na fase terminal, o transplante de rins é a forma de tratamento mais efetivo, possibilitando melhoria na qualidade de vida e sobrevida do paciente em longo prazo. Entretanto, a rejeição do alo-enxerto tem sido considerada um fator que tem gerado grande preocupação na terapia de receptores de transplantes renais (SRINIVAS; MEIER-KRIESCHE, 2008; LO et al., 2014; PARK et al., 2014).

Análises para determinação de compatibilidade envolvem macromoléculas antigênicas que são comuns a todos os linfócitos (BONA, 1972). As macromoléculas são distribuídas na superfície dos linfócitos, permitindo processos como: reações, interações físico-químicas e adsorção (CAI, 2010). Macromoléculas (proteínas) contêm aminoácidos, tais como: lisina, cisteína, histidina e arginina. Os aminoácidos devem ser responsáveis pelo processo de adsorção em função dos grupos NH₂ e SH (BROTTON, 2013; MCDONALD, 2010; MATYSIK, 2001, MOULTON, 2003).

Para a realização de cirurgia de doação de órgãos, para doadores vivos, o processo de seleção requer a tipagem HLA do receptor e dos possíveis doadores, para permitir a seleção do melhor doador entre os candidatos. Considera-se de maior importância à compatibilidade entre os antígenos de classe II, seguido da compatibilidade entre os antígenos HLA-B e, por fim, os antígenos HLA-A. A prova cruzada ou "cross-match", proposta por Terasaki and Mc Clelland em 1964 é empregada para avaliar se o receptor não é sensibilizado contra os antígenos (Ag) de histocompatibilidade do doador e deve resultar negativa. A análise é realizada através de um ensaio "in vitro" no qual uma amostra de soro do receptor é misturado com linfócitos do doador e incubados por um período. Após a incubação, durante a qual deve ocorrer a formação de complexos antígeno-anticorpo (se no soro houver a presença de anticorpos antiHLA), adiciona-se ao sistema, uma fonte de complemento, que deverá provocar a lise de linfócitos reconhecidos pelos anticorpos. Na reação positiva, uma vez que existem anticorpos específicos anti-doador em circulação, se for realizado um transplante, este poderá ser rapidamente rejeitado (TERASAKI; MC CLELLAND, 1964).

Desde 1964, a prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) tem sido a técnica padrão para a avaliação da presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador antes de um transplante. Alo-anticorpos pré-

formados assim detectados podem causar rejeição hiperaguda e perda imediata do enxerto (PICASCIA et al., 2012). A técnica citometria de fluxo (CF), utilizada desde 1983 por Garovoy, é considerada até hoje a mais sensível na detecção de alo-anticorpos é a técnica-padrão para o diagnóstico de atividade humoral através da detecção de baixos títulos de alo-anticorpos circulantes. Prova cruzada através desta técnica é capaz de detectar anticorpos anti-HLA em pacientes que tiveram resultado negativo em prova cruzada por CDC (ROELEN et al., 2012). Pode ser 50 vezes mais sensível do que a CDC e até 15 vezes mais sensível do que a CDC com anti-globulina humana (AGH) (DEMIR et al., 2017; ALHEIM et al., 2015, PATEL; TERASAKI, 1969).

Empregada na verificação de possibilidade de rejeição do alo-enxerto, a biópsia, é invasiva e subclínica, apresentando-se inúmeras vezes imprecisa o que atualmente tem despertado considerável interesse no desenvolvimento de métodos não invasivos e os biomarcadores preditivos de rejeição surgem como alternativa para estimar a rejeição em pacientes transplantados renais (SOLEZ et al., 2008). O impulso no desenvolvimento e aplicação dos biomarcadores apresentam-se como características vantajosas as de serem não invasivos, precisos para alcançar o monitoramento, sensibilidade considerável, frequente e econômico da atividade da doença, buscando assim diminuir os episódios de rejeição clínica precoce e tardia (BETHESDA, 2001). Nesse contexto, os sensores eletroquímicos tem se apresentado como ferramentas adequadas a essas propostas de desenvolvimento de marcadores devido à crescente necessidade de respostas analíticas simples, rápidas e baratas (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010; MANUNU, 2004).

Visto as características apresentadas pelas técnicas CDC e CF aqui abordadas, neste trabalho apresentou-se a construção de um sensor eletroquímico de ouro, capaz de detectar a reação entre os anticorpos e antígenos HLA específicos presentes em amostras de soro, empregando-se a técnica voltametria cíclica, baseando-se no princípio de que o ouro é um material eficiente para imobilização de biomoléculas e por isso tem sido bastante empregado no desenvolvimento de imunobiossensores. As partículas imobilizadas sobre eletrodos apresentam uma amplificação de sinal em eventos que evidenciam a reação entre anticorpo – antígeno (ZHANG et al, 2010).

Um sensor que possa ser utilizado para evidenciar a ligação antígeno anticorpo e complemento, com a redução do tempo de respostas, quando comparados com as técnicas de CF e CDC é a proposta do trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade Anti-HLA, no contexto do transplante de órgãos sólidos, a partir da confecção de um eletrodo de ouro modificado.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Preparar os eletrodos de ouro a partir de folhas de poliéster com depósitos de ouro obtidos por *sputtering*;
- ❖ Obter as células mononucleares a partir da separação por gradiente de densidade em solução *Ficoll – Hypaque*;
- ❖ Imobilizar as células mononucleares sobre a área física do eletrodo de ouro e analisar as respostas eletroquímicas por voltametria cíclica em solução PBS
- ❖ Utilizar amostras de soro controle positivo, soro controle negativo e de complemento (Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular-LIB);
- ❖ Comparar os resultados com os obtidos por técnicas tradicionais de CF e CDC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Transplantes de órgãos sólidos

O termo transplantação em imunologia é o ato de transferir células, tecidos ou órgãos saudáveis de um local para outro. A história relacionada ao processo de transplantes é relatada nos textos da bíblia sagrada, tendo sido iniciada desde os tempos antes de Cristo. Transplantes de órgãos sólidos tiveram início com o transplante renal a partir da segunda metade do século XX. Acreditava-se que apenas transferindo uma parte do rim, poderia se prevenir a doença terminal, uma metodologia que foi mal-sucedida (LAMB, 2000).

O primeiro transplante de um órgão sólido não regenerativo foi um transplante de rim no ano de 1952 na cidade de Boston, realizado por David M. Hume. Neste procedimento foi usado um doador cadavérico. Nos anos seguintes, Hume e seu colega, Joseph E. Murray (ganhador do prêmio Nobel de 1990) continuaram realizando mais dez transplantes de rim com doadores cadavéricos, mas a maioria dos seus pacientes faleceram logo após a realização da operação de transplante. No dia 11 de fevereiro de 1953 um transplante renal foi realizado num paciente que sobreviveu por seis meses (GARCIA, 2015).

O primeiro transplante que foi reconhecido como o primeiro transplante do mundo com um doador vivo (entre gêmeos monozigóticos) ocorreu no ano de 1954 por Murray e John Merrill. Após a cirurgia, o paciente transplantado teve uma sobrevivência de oito anos com função renal satisfatória. A partir desse evento, uma progressiva melhora nos resultados dos programas de transplante renal, na medida em que passou haver melhor avaliação e pareamento dos antígenos além da evolução da terapêutica com medicamentos imunossupressores (Lamb, 2000).

A literatura relata que o primeiro transplante, no Brasil, foi realizado com sucesso em 1954 e a partir desse marco, os transplantes de órgãos sólidos têm sofrido constante avanço no tratamento de doenças do rim, pâncreas, fígado, coração, pulmão e intestino (GARCIA, 2006) .

Segundo Pêgo-Fernandes & Garcia (2010, pag. 51), a descoberta da ciclosporina na década de 70 e sua aplicação clínica inicial como medicamento imunossupressor no início dos anos 80 levaram a melhores resultados no transplante renal. Em consequência dessa descoberta, foram reativados os programas para transplante cardíaco (1984), hepático (1985) e pancreático (1987) e

um programa precoce de transplante pulmonar foi instituído no Brasil no ano de 1989.

Essa primeira descoberta, possibilitou a obtenção de resultados cada vez melhores nos diversos tipos de transplantes, como nos de rim, coração e fígado proporcionando uma sobrevida de até 80% em dois anos aos pacientes transplantados. Como se trata de uma fase experimental, a literatura relata a expectativa dos pacientes com relação à rejeição (Pereira, 2004).

Os primeiros testes de avaliação de tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) ocorreram a partir de 1962, e a prova cruzada entre células do doador e soro do receptor, desenvolvida por Terasaki em 1964 foi introduzida por Kissmeyer-Nielsen em 1966, levou à marcada diminuição na rejeição hiperaguda (TERASAKI; MC CLELLAND, 1964).

Para os doadores vivos, o processo de seleção requer a tipagem HLA do receptor e dos possíveis doadores, para permitir a seleção do melhor doador entre os candidatos. Considera-se de maior importância à compatibilidade entre os antígenos de classe II, seguido da compatibilidade entre os antígenos HLA-B e, por fim, os antígenos HLA-A.

Um teste de compatibilidade bastante utilizado é a prova cruzada ou "cross-match", proposta por Terasaki e Mc Clelland em 1964 e modificada em 1977 por Bodmer e Bodmer, empregado para avaliar se o receptor não é sensibilizado contra os Ag de histocompatibilidade do doador (ainda que seja seu primeiro transplante), o que deve resultar negativa. Esta avaliação é realizada através de um ensaio "in vitro" no qual uma amostra de soro do receptor é misturada com linfócitos do doador e incubada por um período. Após a incubação, durante a qual deve ocorrer a formação de complexos antígeno-anticorpo (se no soro houver a presença de anticorpos anti-HLA), adiciona-se ao sistema, uma fonte de complemento, que deverá provocar a lise de linfócitos reconhecidos pelos anticorpos. Na reação positiva, uma vez que existem anticorpos específicos anti-doador em circulação, se for realizado um transplante, este poderá ser rapidamente rejeitado.

A reação de "cross-match" positiva pode ser observada em pacientes que foram submetidos a transfusões múltiplas, mulheres múltiparas ou indivíduos que já foram previamente transplantados. Na realidade, um cross-match positivo nem sempre é sinônimo de mau prognóstico para o enxerto/receptor. Assim, nos casos supra referidos, se o cross-match for positivo para linfócitos totais do sangue

periférico, o teste é repetido com suspensão rica em células T ou em células B. Se o teste for negativo para células B, o transplante pode ser realizado. Se for positivo para B, o teste é repetido para verificar se os antígenos reconhecidos são anti-MHC I ou anti-MHC II. A presença de anticorpos (ou linfócitos B) anti-MHC II, não contraindica o transplante.

Outra técnica utilizada, nesses testes, a de citometria de fluxo (CF) utilizada desde 1983 por Garovoy, é considerada até hoje a mais sensível na detecção de alo-anticorpos, é uma técnica-padrão para o diagnóstico de atividade humoral através da detecção de baixos títulos de alo-anticorpos circulantes. Prova cruzada através desta técnica é capaz de detectar anticorpos anti-HLA em pacientes que tiveram resultado negativo em prova cruzada por CDC (ROELEN et al., 2012). Pode ser 50 vezes mais sensível do que a CDC e até 15 vezes mais sensível do que a CDC com anti-globulina humana (AGH) (DEMIR et al., 2017; ALHEIM et al., 2015, PATEL; TERASAKI, 1969).

Devido ao crescente número de pacientes com necessidade de transplantação, foi criado o primeiro programa de intercâmbio de órgãos, o Euro-transplante (Woodruff, 1951) e como demonstrado até aqui, a rejeição do alo-enxerto desde o começo da história do transplante, tem sido considerada um fator que tem gerado grande preocupação na terapia de receptores de transplantes renais (SRINIVAS, AND MEIER-KRIESCHE, 2008; LO et al., 2014; PARK, et al., 2014).

A lista de espera é a única opção para aqueles pacientes renais que não possuem contraindicações e que não encontram um doador entre seus familiares até o quarto grau de parentesco, doação de cônjuges ou de qualquer outra pessoa (BRASIL, 2015).

De acordo com a Associação Brasileira de Transplantes e Órgãos (ABTO, 2018), o Brasil é o segundo país em número absoluto de casos de realização de cirurgias de transplante renais, apresentando entre janeiro e dezembro do ano de 2018 um número total de 4429 cirurgias, perdendo apenas para os Estados Unidos que apresentou, no mesmo semestre, 17107 cirurgias de transplantes renais. Outras cirurgias de transplantes que são comumente relatadas nos dados da ABTO são as de coração, pulmões, fígado, pâncreas, medula óssea e de córnea.

Em contrapartida ao aumento da quantidade de doações de rins, o aumento anual da quantidade de novos casos de pacientes com doença renal em estágio final e que necessitam de realização da cirurgia de transplante do órgão, assim como o

crescente *gap* entre a procura e a oferta de rins levou à expansão cada vez maior da espera de transplante renal na lista mundial. Isto se tornou um grande problema, pois muitos pacientes morrem enquanto esperam para receber a oferta de um rim.

A fila de pacientes que esperam um transplante é única para todos os estados do país e a alocação dos órgãos é regulamentada pela legislação específica e controlada pelo Sistema Nacional de Transplante, a distribuição é feita com base no exame de compatibilidade HLA (Human Leucocyte Antigen) (ABTO, 2015, BRASIL, 2009).

A doação de órgão é um tema que é bastante debatido tanto de discussões formais entre os profissionais da medicina, nos questionamentos da ciência e na sociedade devido à sua complexidade. Portanto, existe a necessidade de fazer da doação um assunto de conhecimento público. Há sem dúvida a necessidade de desenvolvimento de novos testes que tenham o objetivo de avaliação da compatibilidade entre possíveis doadores e receptores de órgãos, de forma rápida, que permita a avaliação de uma maior quantidade de pacientes que aguardam um transplante na lista de espera, bem como uma maior sensibilidade e especificidade durante a realização dos testes.

Sabe-se que as análises para determinação de compatibilidade envolvem a utilização linfócitos que são moléculas ricas em proteínas. As proteínas, por sua vez, estão distribuídas na superfície e permitem a ocorrência de processos como, por exemplo, reações, interações físico-químicas e adsorção (CAI, 2010).

Existem na literatura, inúmeros trabalhos que relatam o desenvolvimento de sensores eletroquímicos capazes de evidenciar interações proteicas em diferentes superfícies metálicas (Ahmed, 2017; Cheuquepan, 2017; Trišovic, 2015; Wang, 2014). O impulso no desenvolvimento e aplicação dos biossensores apresentam como características vantajosas as de serem não invasivos, precisos para alcançar o monitoramento, sensibilidade considerável, frequente e econômico da atividade da doença, buscando assim diminuir os episódios de rejeição clínica precoce e tardia (NANKIVELL, 2010).

Considerando o contexto citado, o grupo de pesquisa, Bioeletroquímica-UFPI, com a ajuda de outros pesquisadores desenvolveu um eletrodo de ouro, para ser utilizado em análises de moléculas e biomoléculas, orgânicas e inorgânicas, tais como: enzimas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), anticorpos ou antígenos, micro-organismos, células animais e vegetais, cortes de tecidos, fármacos,

neurotransmissores e poluentes químicos, dentre outros. Esse eletrodo foi inicialmente empregado no estudo desenvolvido por Moura-Melo e colaboradores (2017, pag.1), envolvendo a determinação de transgenia em milho a partir do evento P35S. Para o rastreamento foi utilizada uma sequência de DNA específica fixada ao eletrodo e uma terminal enzimático, o qual revela, na presença de água oxigenada, a quantidade de transgênicos na amostra.

Em outro trabalho, desenvolvido com o emprego do eletrodo, por Santiago (2018) para determinação de testosterona em amostras de urina sintética. O eletrodo de ouro foi modificado com polianilina e nanopartículas de ouro. A metodologia empregada mostrou-se seletiva, sensível, estável e rápida.

Nesse trabalho, especificamente, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico, de baixo custo, para a determinação de reatividade anti-HLA, no contexto do transplante de órgãos sólidos, onde foi empregado amostras de linfócitos de doadores anônimos para realização de testes qualitativos.

3.2 Biossensores

De acordo com a definição recomendada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), biossensor é um dispositivo no qual a reação bioquímica específica, mediada por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras são utilizados por meio de um transdutor que converte a resposta biológica em um sinal analítico detectável. A detecção geralmente é realizada por sinais elétricos, térmicos ou ópticos (THEVENOT, 1999).

O primeiro registro de construção de biossensor amperométrico foi realizado por Clark e Lyons em 1962, denominado por estes de "eletrodo enzimático" ou "eletrodos de oxigênio". Nesse biossensor, a enzima oxidase da glicose é imobilizada através de uma membrana semipermeável na superfície de um eletrodo platina. Mais tarde, Updike e Hicks construíram o primeiro sensor biocatalítico funcional para a determinação de glicose no sangue. Esses primeiros eletrodos são considerados a primeira geração de biossensores.

A detecção e a quantificação confiável de diferentes tipos de analito tornou-se uma questão de grande importância na realização de diversos diagnósticos. Em consequência disso, tem-se observado o aumento de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de dispositivos analíticos simples e baratos, de fácil manuseio, que

necessitam de baixo consumo de amostra a ser analisada e que permitam realizar análises rápidas que possam ser empregados em escala industrial (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010; FU, 2009).

No reconhecimento molecular de diversas substâncias, os biossensores têm sido empregados como auxílio vantajoso, podendo ser empregados em diversos tipos de análises, como; diagnósticos clínicos, no controle ambiental na monitoração de substâncias como fenóis, pesticidas e metais pesados, na análise da composição de alimentos, na concentração de nutrientes e corantes e na detecção de drogas ilícitas e na marcação de doenças humanas e em animais (BILLAN, 2010; PAN, 2010; SHEN et al , 2015; LIU, 2011).

De forma geral, os biossensores são denominados dispositivos que combinam a atividade seletiva de elementos de reconhecimento biológico podendo ser enzimas, DNA, antígenos, anticorpos, células, organelas, tecido animal ou vegetal, entre outros, que sejam sensíveis a um analito de interesse, a um transdutor que converte a reação de reconhecimento em um sinal mensurável, que pode ser elétrico, térmico ou acústico.

Em relação à resposta, os biossensores podem ser vantajosos, pois em relação às ferramentas atuais de diagnósticos, como por exemplo, ELISA, apresentam como características alta sensibilidade e especificidade, simplicidade, rapidez em termos de respostas, baixo custo, portabilidade e facilidade de automação (MALHORTA et al., 2006). Na construção de um biossensor podem ser utilizados diferentes tipos de materiais com o objetivo de contribuir na imobilização do analito de interesse, objetivando todos esses critérios supracitados e também como possibilitando a obtenção de limites de detecção cada vez menores.

3.2.1 Elementos básicos para a construção de um biossensor

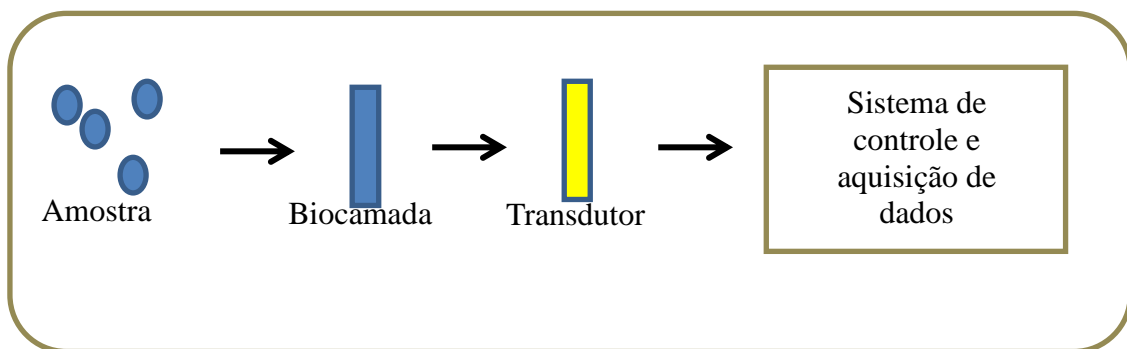
Um biossensor é um dispositivo constituído por duas partes: uma parte biológica e uma parte transdutora. O transdutor tem a função de promover o processamento do sinal elétrico que é proporcional em magnitude ou frequência à concentração do analito. Quando unidas essas duas partes são capazes de detectar componentes biológicos qualitativamente ou quantitativamente (MALHORTA, 2006; THEVENOT, 2001).

Na construção do biossensor, o elemento de reconhecimento (analito) é imobilizado sobre a superfície do eletrodo de trabalho, o que exige conhecimento das características das amostras de trabalho e o que se pretende analisar. Nesse caso, a bionanotecnologia tem oferecido uma enorme possibilidade de substratos, em que permitem por sua vez, a produção de diferentes biossensores (GIANNNETO et al, 2014).

Na produção de biossensores, alguns fatores devem ser levados em consideração, dentre os quais, a seleção do bioelemento adequado ao analito a ser detectado, a escolha do método de imobilização do analito, adequação de um transdutor, linearidade e minimização de interferência. Levando em consideração o desempenho do biossensor, é necessária uma concentração adequada do bioelemento, baixas interações não específicas e uma camada biológica estável (GORODKIEWICZ et al., 2010; MONOŠÍK, 2012, DINH et al., 2000).

A Figura 1 apresenta os principais componentes de um biossensor.

Figura 1. Principais componentes de um biossensor



Fonte: autora, 2019.

Uma vez que ocorre a interação da amostra com o receptor, este gera um efeito que será captado pelo transdutor, o qual irá produzir um sinal elétrico ou óptico. As principais medidas ópticas realizadas pela transdução são: as medidas de luminescência, absorção, ressonância de plasma de superfície, entre outras, medidas de massa, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O transdutor pode ser um eletrodo, fibra óptica ou quartzo oscilante. No desenvolvimento de biossensores, diversas moléculas biológicas

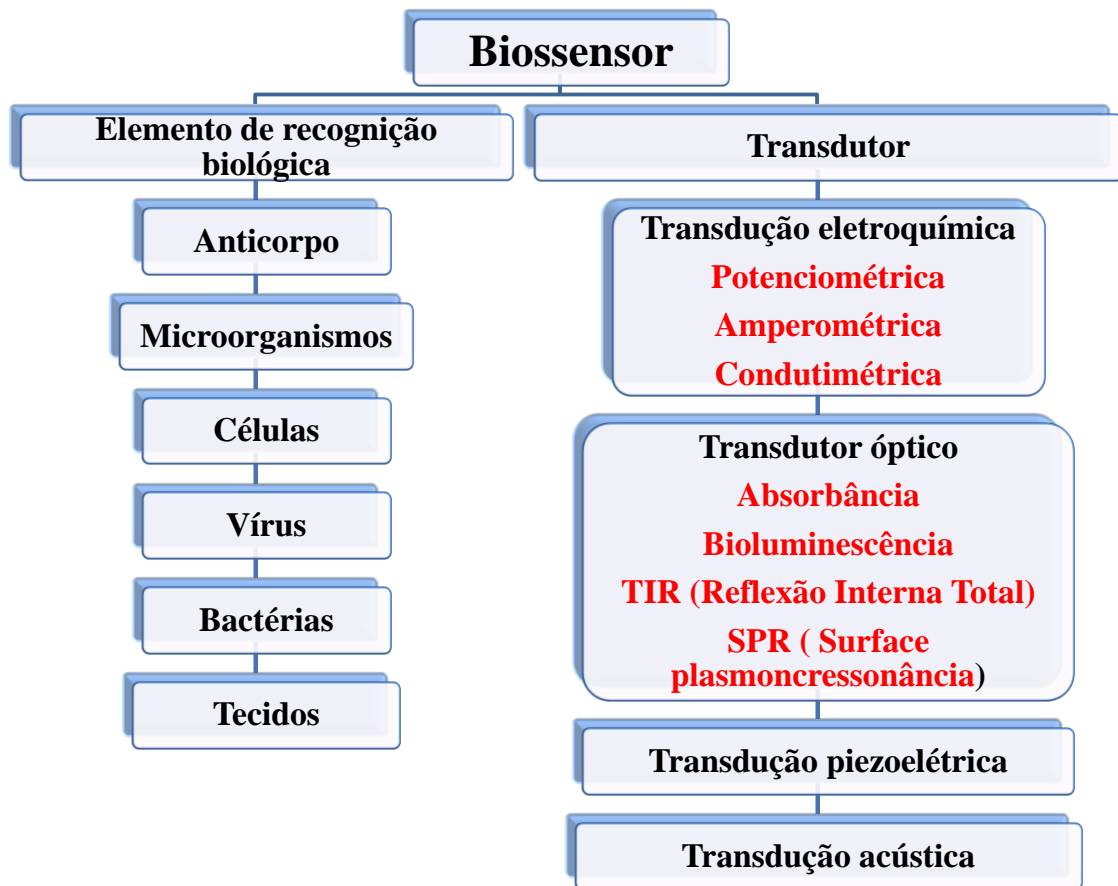
podem ser utilizadas, tais como, enzimas, sistemas multienzimáticos, anticorpos, antígenos, organelas, peptídeos (GORODKIEWICZ et al., 2010).

Um biossensor ideal não existe, mas algumas características desejáveis para que um biossensor seja considerado ideal podem ser levadas em consideração. Dentre estas características estão o tempo de resposta reduzido, o que promove uma resposta em tempo real da presença ou atividade do analito, elevada estabilidade, tanto operacional como de armazenamento. A interface com o usuário, de forma que exija pouca habilidade e conhecimento do operador, além de baixo custo unitário, reprodutibilidade, precisão robustez e possibilidade de reutilização (MEHVAR, 2004; WANG, 2006).

Atualmente, as áreas em que podem ser aplicados os biossensores estão em constante crescimento, dentre elas podemos citar, controle de bioprocessos, no diagnóstico de doenças, na segurança alimentar, no monitoramento ambiental, análise forense e aplicações militares e médicas (VERMA; BHARDWAJ, 2015; MURUGAIYAN et al, 2014; D'ORAZIO, 2011; WANG, 2014; YANES-SEDENO, 2014).

Existem muitos tipos de biossensores e geralmente são classificados de acordo com o tipo de transdutor ou com o tipo de reconhecimento biológico empregado e ainda, podem ser classificados de acordo com o tipo de substâncias a serem detectadas. A Figura 2 apresenta um resumo dessa classificação dos biossensores de forma resumida.

Figura 2. Classificação dos biossensores



Fonte: autora, 2019.

Na classificação para os biossensores elaborada por Malhorta (2000) e Lequin (2005), estes podem ser classificados em:

- Biossensores enzimáticos; os quais empregam enzimas (por exemplo glicose oxidase, a urease, a penicilinase e a dehidrogenase de álcool) como elementos bioreceptores (DU et al, 2018).
- Imunobiossensores: que são biossensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nos quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície (GIANNETO et al, 2014)
- Biossensores celulares: que utilizam microorganismos, especialmente para o monitoramento ambiental de poluentes (PERUMAL; HASHIM. 2014)

- Biosensores eletroquímicos: consistem de dois componentes. Um elemento biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor (eletrodo) que "traduz" o evento de biorreconhecimento em um sinal elétrico útil. Estes podem ser de três tipos: potenciométrico, amperométrico e condutométrico (RASSAEI, 2011);
- Sensores ópticos: sensores que são baseados em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias, com a finalidade de monitorar a concentração do analito (GERARD et al, 2004).
- Biosensores acústicos: baseados na propriedade da piezo-eletricidade que os cristais anisotrópicos possuem) (HIDEAKI, 2003).
- Biosensores calorimétricos: que usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito) (PERUMAL, 2014).

A partir destas duas classificações serão abordados nesta revisão, os principais métodos de detecção e os princípios básicos de cada um dos tipos de biosensores, tendo como classificação para estes, a biocamada e o tipo de transdutor empregado.

3.3 Classificação de biosensores com base na transdução do sinal

3.3.1 Métodos de detecção eletroquímicos

A literatura aponta os transdutores de detecção eletroquímicos como os mais antigos e mais comumente utilizados. A detecção eletroquímica pode ser classificada de três tipos: a amperométrica, potenciométrica e condutimétrica.

A amperométrica ocorre pela transferência de cargas após um potencial ou rampa de potencial. Uma corrente é gerada pela oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo. O sinal gerado pela reação é diretamente proporcional à concentração das espécies envolvidas (GRIESHABER, 2008).

Nas medidas potenciométricas, o potencial é medido ao ser aplicado valores de correntes fixos ou rampas. Nas detecções condutimétricas, ocorre mudanças na condutância entre eletrodos. A espectroscopia de impedância eletroquímica é outra

técnica que monitora a resistência e a reatância no biossensor e que também está se tornando mais comum sua utilização.

Dentre estes quatro tipos de transdutores, os potenciométricos e amperométricos são os que mais são utilizados em pesquisas. Contudo, subsistem alguns desafios incluindo alto desempenho e rentabilidade que caracterizam basicamente o objetivo das pesquisas que têm sido desenvolvidas nos últimos anos (STRADIOTTO, 2003).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a biocamada e o transdutor empregado. Com relação à biocamada, podem ser classificados em: enzimáticos, celulares, de anticorpos, receptores, de ácidos nucleicos e aptâmeros. A transdução eletroquímica pode ser dividida em três tipos: potenciométrico, amperométrico e impedância.

3.3.1.1 Biossensores potenciométricos

São sensores que tem sua atividade baseada na medida do potencial de uma célula eletroquímica, tendo como fixo o valor da corrente. Exemplos comuns são o eletrodo de pH de vidro e eletrodos seletivos de íons para íons, como K^+ , Ca^{2+} . Os sensores utilizam uma célula eletroquímica com dois eletrodos de referência para medir o potencial através de uma membrana que reage seletivamente com o íon carregado de interesse.

Neste tipo de transdução, a mudança do potencial de um sistema é medida com base na equação de Nerst em que,

$$\text{Potencial} = K + \frac{2,303RT}{ZF} \text{Log} \alpha_i$$

E as mudanças no potencial estão relacionadas à atividade iônica específica. Devido a isso esses transdutores podem ser denominados muitas vezes de eletrodos íons seletivos ou de transistores de efeito de campo sensíveis a íons. O sensor consiste em uma camada externa seletiva de um material bioativo. O pHmetro é o sensor potenciométrico mais conhecido, utilizado em química analítica (LUPPA, 2001).

Na reação quando catalisada por enzimas, o eletrodo enzimático é considerado eletrodo de íons, e este gera ou consome uma espécie que é detectada

pelo eletrodo seletivo de íons e gera um sinal logarítmico, dependente da concentração. A principal aplicação deste tipo de eletrodos encontra-se na determinação de enzimas (POHANKA, 2008).

3.3.1.2 Biossensores amperométricos

São biossensores baseados na medida da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, momento em que ocorre a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa. A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito e pode ser controlada pela aplicação de um potencial elétrico no eletrodo (THÉVENOT et al., 2001; WANG et al., 2008).

Uma célula amperométrica pode conter dois ou três eletrodos. Uma vantagem deste sistema é que a carga da eletrólise passa pelo eletrodo auxiliar em vez de passar pelo eletrodo de referência, que tem a função de proteger a referência de possíveis mudanças no seu potencial de meia-célula. Um sistema de dois eletrodos possui apenas dois eletrodos, eletrodos de trabalho e de referência. Se a densidade da corrente for baixa o suficiente ($\mu\text{A cm}^{-2}$), o eletrodo de referência pode carregar a carga sem efeito adverso. Esses dois sistemas, de três eletrodos e dois eletrodos, são comumente utilizados no desenvolvimento de sensores. No entanto, dois eletrodos são geralmente preferidos para sensores descartáveis porque a estabilidade a longo prazo da referência não é necessária e o custo é menor (RONKAINEN, 2010).

Os eletrodos de trabalho geralmente incorporam metais nobres, grafite e formas modificadas de polímeros de carbono ou condutores a que o anticorpo é imobilizado. Biossensores amperométricos às vezes são prejudicados pela necessidade de rotulagem e separação de etiquetas livres. (D'ORAZIO, 2003).

Os biossensores amperométricos são classificados em primeira, segunda e terceira geração. Nos biossensores de primeira geração o acoplamento entre enzima e eletrodo é baseado na eletroatividade do substrato ou do produto da reação enzimática. Nos biossensores de segunda geração esse acoplamento é garantido pelo uso de mediadores ou de cofatores que atuam na transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo. O principal objetivo do uso de mediadores é a transferência de elétrons oriundos de reações redox

paralelas à reação entre a enzima e o substrato e podem ser de naturezas orgânica, inorgânica, polímeros condutores ou complexos de metais de transição. Os biossensores amperométricos de terceira geração não utilizam esses mediadores, a transferência eletrônica é direta, e devido a isso, são os mais utilizados. Apresentam potencial de minituarização, sensibilidade e seletividade melhoradas (DI, 2004).

3.3.1.3 Biossensores condutimétricos

Neste tipo de biossensor, as mudanças são observadas nas medidas de condutância, resultante de produtos de reação catalítica. São geralmente utilizados na detecção de enzimas como a urease, cuja atividade origina produtos iônicos (OLIVEIRA et al., 2013).

3.3.2. Biossensores ópticos

São biossensores que se baseiam nas mudanças das propriedades ópticas de substâncias em resposta à reação bioquímica para a detecção do analito. São empregados em sistemas em que se pretende obter uma detecção direta. Neste caso, o produto de interesse é a luz, que uma vez capturada em uma fibra óptica pode ser determinada, pode ser definida como resultado de uma reação química ou biológica (GESCHWINDNER, 2012).

Ao incidir sobre a amostra biológica, as moléculas da amostra absorvem em determinado comprimento de onda, dependendo do número e tipos de moléculas. Em seguida, o espectro de luz dispersa ou que atravessa é medido e comparado com um sinal de calibração, o que permite então determinar a concentração do analito (ENDO, 2008).

Entre as propriedades ópticas que podem ser utilizadas estão: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda. Entre as vantagens desses biossensores estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada. Cabe ressaltar que o biossensores ópticos podem responder a mais de um analito, quando utilizados reagentes que possibilitem a absorção ou emissão a diferentes comprimentos de onda (FAN, 2008).

Os sensores ópticos e os detectores baseados na Ressonância Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) de nanopartículas de metais nobres tem ganhado importância nos últimos anos devido à sua maior sensibilidade e maior tempo de resposta (NAIK, 2018). A literatura científica mostra que o autor Endo et al., 2008 introduziu, pela primeira vez, nanopartículas de prata revestidas com a polivinilpirrolidona, como uma sonda óptica para a determinação quantitativa de espécies reativas de oxigênio (ROS). No artigo, os autores propuseram que a decomposição catalítica de agrupamento das nanopartículas, na presença de H_2O_2 é responsável pela redução de intensidade no LSPR. Desde então, as AgNPs, são produzidas por vários protocolos sintéticos e estabilizado com diferentes agentes de cobertura, foram utilizados para melhorar a resposta do detector

3.3.4. Biossensores piezoelétricos

Também conhecidos na literatura como biossensores acústicos. Baseiam-se na propriedade de piezo-eletricidade que os cristais anisotrópicos apresentam, por exemplo, os cristais de quartzo (JIANG et al., 2008). Quando uma tensão alternada é aplicada a este biossensor, o cristal de quartzo oscila com uma determinada frequência, sendo tal frequência associada à massa e às constantes elásticas do cristal. O mais antigo e conhecido biossensor acústico é o de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM - Quartz-Crystal Microbalance), utilizado em várias aplicações e é também facilmente integrável (PATEL, 2002; MUTLU et al., 2008).

Nesses biossensores, são levados em consideração os efeitos de interferência viscoelástica e eletroacústica devido ao líquido da amostra e aos filmes absorvidos nestes. Os avanços nos sensores piezoelétricos incluem o uso de QCM e microcantilevers (MCGOVERN, 2008).

3.3.5 Biossensores calorimétricos

Também conhecidos como biossensores termométricos. Esses biossensores utilizam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito (THEVENOT et al., 2001). São baseados em uma das propriedades fundamentais das reações biológicas, a absorção e liberação de

calor. As mudanças de temperatura são geralmente determinadas por termistores de alta sensibilidade (GERARD, 2002).

Um termistor enzimático (ET) é um biossensor calorimétrico de injeção de fluxo que detecta diretamente o calor desenvolvido durante a reação catalisada por enzima. O seu princípio de detecção universal permite uma estratégia sem etiqueta que simplifica o ensaio e o design do instrumento. Outra vantagem desses biossensores é a medição sem contato que diminui a interferência do sinal e dissipa o risco de contaminação do sensor, e dessa forma melhora significativamente a estabilidade operacional e reduz a taxa de recalibração. O trabalho de Chen et al (2013) demonstra esse tipo de biossensor e sua aplicação na detecção de ureia e lactato em leite adulterado, para observação de interferentes em amostras.

A literatura apresenta esses biossensores possuindo bastante aplicabilidade, como no artigo publicado por Zhou et al (2013, pag. 100) em que foi desenvolvido um biossensor térmico para determinação de β -lactamases no leite, monitorando a conversão da penicilina G usando o biossensor térmico. A penicilina G adicionada como marcador é especificamente hidrolisada pela β -lactamase, portanto, a quantidade de β -lactamase no leite, nesse caso, pode ser determinada pela quantidade de penicilina G consumida durante a incubação.

3.4. Classificação com base no elemento de reconhecimento biológico (biocamada)

Nessa etapa, vale ressaltar que alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, dentre eles, pode-se classificar a necessidade de um sítio reativo disponível capaz de reagir e/ou interagir com o analito, a estabilidade face ao meio e também as condições de medição e possibilidade de modificação/ imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho. Concluindo, são estas características principais que definem um biossensor tendo como base a biocamada (RONKAINEN, 2010).

3.4.1 Biossensores enzimáticos

Nestes biossensores, enzimas, são empregadas como elementos de bioreconhecimento. Bastante conhecida, a enzima glicose oxidase é amplamente utilizada na medição de glicose no sangue. Também várias outras enzimas são utilizadas na construção de biossensores, tais como a urease, a penicilinase e a dehidrogenase de álcool.

A literatura aponta como o primeiro eletrodo enzimático na década de 60 quando Clark e Lyons (1962) tiveram a ideia de usar uma enzima aliada a um eletrodo para determinação de glicose para controle de diabetes. Esse biossensor foi baseado na oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima glicose oxidase, de forma que o oxigênio ou peróxido consumido poderiam ser detectados.

A utilização destes biossensores enzimáticos é limitada devido a estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito a variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que podem ser contornados usando as condições adequadas de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática (LEONARD, 2003).

Em contrapartida, a vantagem do uso deste componente é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos, pois apresentam um alto nível de especificidade com o substrato devido principalmente à ligação forte na molécula de substrato pelo seu sítio ativo envolvendo fatores do meio ambiente

reacional tais como, tamanho da molécula substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação (CAMPANELLA, 2008).

A GOx é altamente específica para b-D-glucose, e pode ser detectada através das seguintes reações 1, 2 e 3 (MAIGA, 2017; ABELLÁN-LLOBREGAT, 2017).



A GOx é uma enzima prontamente disponível, barata e estável de *Aspergillus Niger* que está entre as enzimas mais importantes em aplicações de biossensor e processos industriais. O artigo publicado por Maiga e colaboradores no ano de 2017, aponta essa característica e aplicação da Gox, uma vez imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, esta pode ser detectada pelas técnicas de fluorescência e amperometria. O objetivo do estudo foi desenvolver um biossensor baseado em poli (amic) ácido seccionado (BG-PAA) para ser utilizado como material de suporte de enzimas.

3.4.2 Biossensores celulares ou microbiológicos

Estes biossensores utilizam microorganismos especialmente para o monitoramento ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biossensores enzimáticos. Contudo apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade (CORTES, 2011).

Também conhecidos como biossensores microbianos, utilizam células vivas como elemento de reconhecimento. Microorganismos como bactérias e fungos são geralmente utilizados como biorreceptores para a detecção de moléculas específicas ou o estado geral de um ambiente circundante pode ser utilizado. As enzimas que são proteínas presentes nas células podem ser utilizadas como biorreceptores (CIUCU, 2014)..

3.4.3 Imunobiossensores

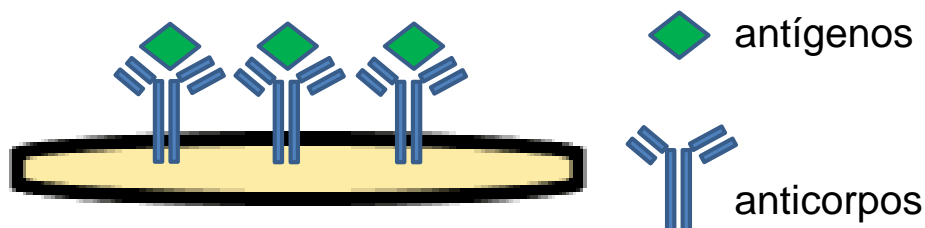
São biossensores que utilizam proteínas globulares (imunoglobulinas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) do soro que formam parte de um importante grupo de proteínas altamente ligáveis. Os anticorpos ligam-se aos antígenos, com alta especificidade e alta afinidade. As variantes em polipéptidos de cadeia pesada permitem que cada classe de imunoglobulina funcione como um tipo diferente de resposta imune ou durante um estágio adiferente da defesa do corpo (HARBOE, 1973; CHOTHIA, 1987).

Elementos comuns em imunobiossensores são antígenos anticorpos e antígenos específicos. Por exemplo, em imunobiossensores eletroquímicos, os antígenos são imobilizados na superfície dos eletrodos. Quando os anticorpos se ligam aos antígenos imobilizados, são gerados sinais elétricos (ROBINSON, 2002; TANG et al., 2006; WANG et al., 2005).

Um problema bastante relatado para o desenvolvimento destes tipos de biossensores, e encontra-se na abordagem de que os antígenos, que são proteínas moléculas, podem desnaturar a superfície sólida. Para endereçar isto questão, mais e mais estudos nos últimos anos estão focados no uso um pedaço de oligopéptido linear (em vez de toda a proteína de antígeno moléculas), para o desenvolvimento de imunobiossensores (MASON et al., 2009).

Em geral, nos uma ilustração esquemática do mecanismo de um imunossensor padrão a reação ocorre de forma como apresentado na Figura 3, na qual se inicia com a formação do complexo antígeno/anticorpo, o que produz um sinal mensurável que por sua vez pode ser transduzido eletroquimicamente, termometricamente, opticamente ou piezoelétrico (JUNG, 2008).

Figura 3. Formação do complexo antígeno/anticorpo em diferentes superfícies transdutoras

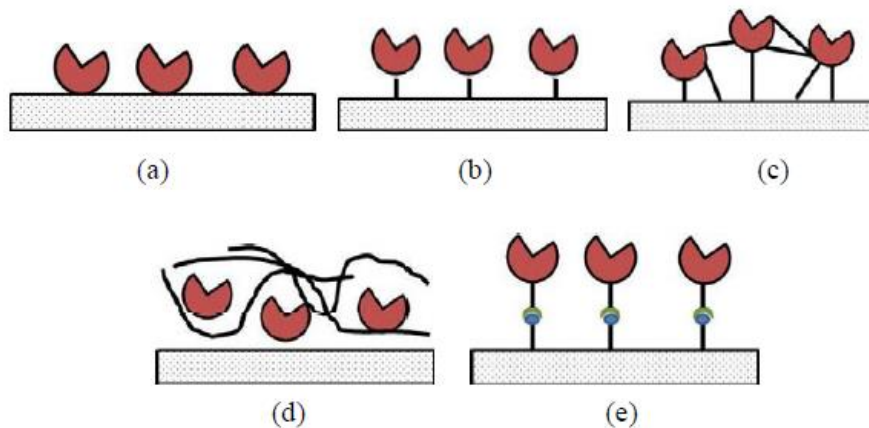


Fonte: Adaptado: Felix (2018).

3.5 Técnicas de imobilização

As técnicas mais comuns de imobilização são adsorção física e química. A estabilidade das técnicas de imobilização que a serem empregadas, determinam a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor devido à preservação dos sítios ativos da molécula. Na imobilização física ou direta (que envolvem interações fracas, do tipo iônica e polar e ligação de hidrogênio), ligação cruzada (reticulação), oclusão ou aprisionamento, ligação covalente e covalente cruzada, encapsulamento e microencapsulamento (LIU, 2001; GARCINUNO, 2000). A Figura 4 apresenta as principais estratégias de imobilização de forma objetiva, de acordo com Oliveira, JE, (2013, p. 5) e colaboradores.

Figura 4. Principais técnicas de imobilização: (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) encapsulamento e (e) afinidade



Fonte: Oliveira, 2013.

Com relação ao método de imobilização química ou de ligação covalente, é empregado o princípio segundo o qual alguns grupos químicos presentes (e não essenciais para a atividade biológica da molécula) se ligam aos suportes quimicamente ativos. Comparado à imobilização direta, requer maior tempo de análise e é mais difícil de ser realizado, pois requer uma cobertura máxima de uma monocamada (PEREIRA, 2002).

Os outros métodos que não empregam ligação covalente apresentam desvantagens como, por exemplo, como ligações não muito estáveis que podem ser

facilmente influenciadas pela temperatura do meio e pH reacional (KRAJEWSKA, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados na pesquisa foram de grau analítico e especificados a seguir. A água foi purificada com um sistema de purificação, *Purelab Option Q*.

- ✓ Células mononucleares
- ✓ Solução PBS (pH=7,2);
- ✓ Solução H₂SO₄ 0,5 mol/L
- ✓ Solução fisiológica
- ✓ Develope
- ✓ PBS Citrato

4.1 Instrumentação eletroquímica e construção do eletrodo de trabalho

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato, Autolab Metrohm, modelo pgstat 302, controlado pelo software NOVA 2.0.2 apresentado na Figura 5. Utilizando uma célula convencional de três eletrodos. Os eletrodos foram: o de trabalho (ouro), o de referência (Ag/AgCl/KCl(sat)) e o contra eletrodo de platina. As análises foram realizadas através da técnica de voltametria cíclica (VC) (MOURA-MELO, 2017).

Figura 5. Potenciostato/galvanostato para medidas eletroquímicas



Fonte: autora, 2019.

Todos os experimentos eletroquímicos foram feitos em uma célula eletroquímica de vidro com capacidade de 150 mL, contendo o eletrodo de ouro (eletrodo de trabalho) obtido por deposição física a vapor, o eletrodo de platina (eletrodo auxiliar) e o eletrodo de prata-cloreto de prata (eletrodo de referência), como apresentado na Figura 6.

Figura 6. Célula eletroquímica utilizada com entrada para três eletrodos. CE = eletrodo auxiliar; ER = eletrodo de referência; ET = eletrodo de trabalho



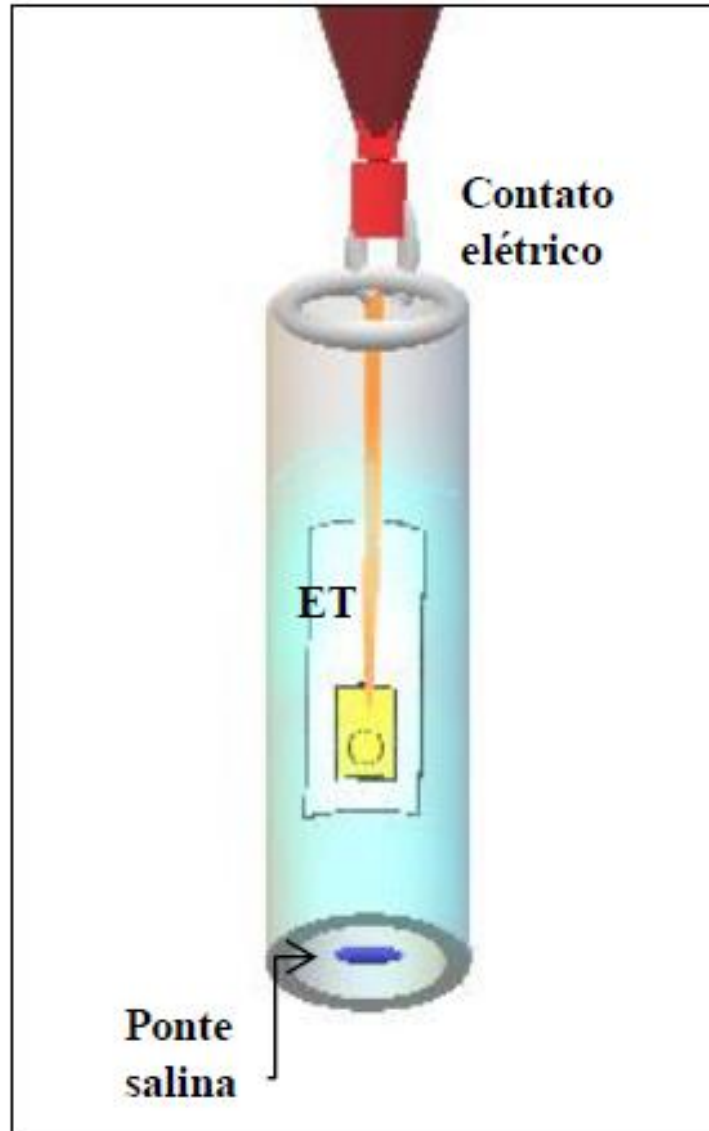
Fonte: autora, 2019.

Já para as análises voltamétricas de deposição das células, foram realizados experimentos em uma microcélula, com capacidade de 1,5 mL, também confeccionada e inserida à célula eletroquímica, como apresentado na Figura 7.

Esse dispositivo foi utilizado nesta pesquisa com a finalidade de que o processo de difusão das soluções de pequeno volume fosse minimizado em relação

à célula maior, permitindo assim que o contato entre a superfície do eletrodo e essas soluções fosse mais eficiente.

Figura 7. Microcélula eletroquímica para o eletrodo de ouro



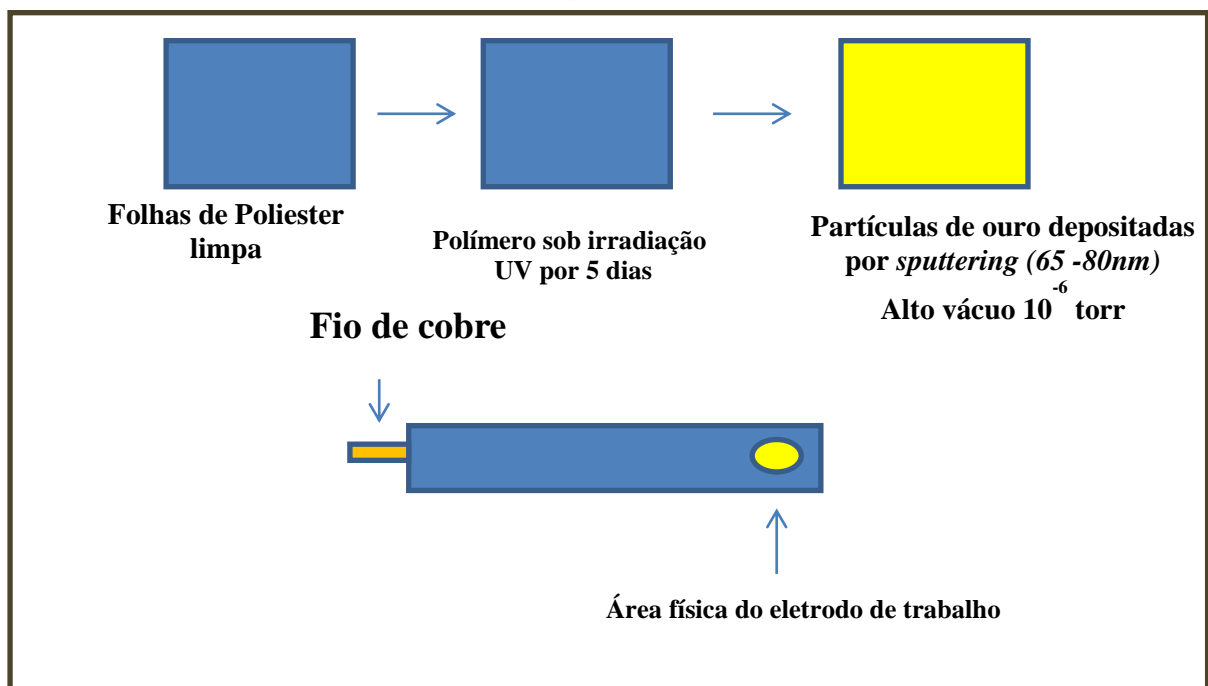
Fonte: autora, 2019.

O eletrodo de trabalho, esquema de montagem na Figura 8, foi confeccionado, conforme modelo construído inicialmente por Moura-Melo e colaboradores (2017), a partir da deposição de um filme fino de ouro, realizada em uma câmara de vácuo *Edwards 306*, com revestimento para evaporação térmica de um fio de ouro (99,99% de pureza), em alto vácuo (10^{-6} torr) com posterior

condensação em uma peça de poliéster previamente irradiada com ultravioleta (360 nm) por 5 dias, conforme a Figura 8 representa um esquema de montagem do eletrodo.

A camada de ouro obtida possui espessura entre 65 e 80 nm. O contato elétrico é feito, nesse eletrodo aqui confeccionado, foi realizado com um fio de cobre. Finalmente, as laterais foram envolvidas com fita Teflon para proteger o eletrodo de possíveis infiltrações, quando colocado em contato com as soluções.

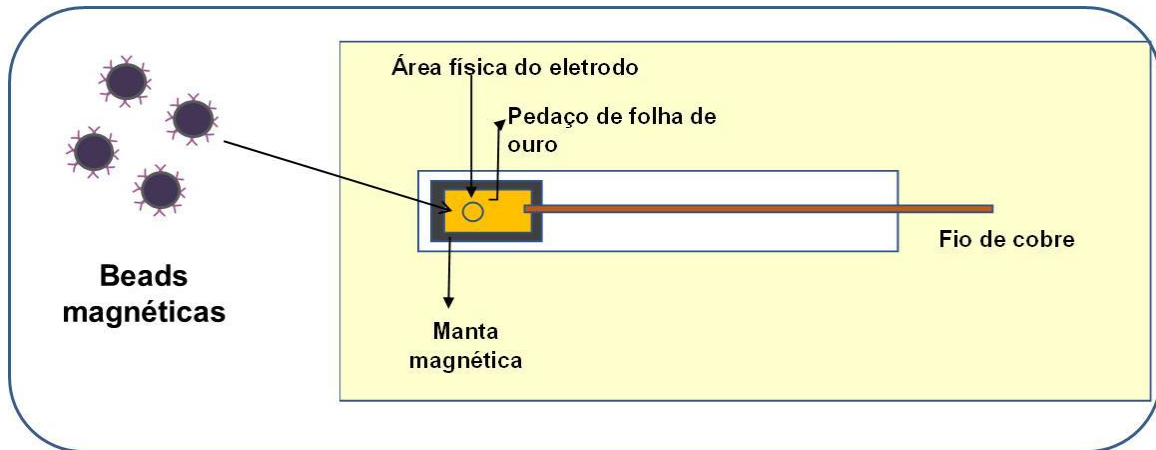
Figura 8. Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de ouro



Fonte: autora, 2019.

Na sequência deste trabalho foi acoplado à área física do eletrodo(lado), manta magnéticas adesivadas, recortadas em pedaços, para os ensaios realizados com as esferas magnetizadas que contem na sua superfície anticorpos monoclonais (anti-CD3 e anti-CD19), para realização de posterior caracterização eletroquímica dos anticorpos monoclonais, de acordo com a Figura 9.

Figura 9. Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de Au com manta magnetizada acoplada



Fonte: autora, 2019.

4.2 Limpeza e condicionamento do eletrodo de trabalho

Inicialmente a superfície de ouro foi mantida a um potencial de 0 V no intervalo de tempo de 10s. Depois, o eletrodo foi limpo eletroquimicamente com ciclos de potencial em pH ácido (velocidade de varredura 0,2 V/s; em H₂SO₄ a 0,5 M) em uma faixa de potencial entre -0,1 e 1,55 V, para verificar se os processos de oxidação e redução do ouro aqui tratado, até que fosse obtido um voltamograma redox estável típico de ouro policristalino. Todos os eletrodos ao serem submetidos a esta etapa, apresentaram área geométrica em torno de $3 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ e diâmetro de 2 mm.

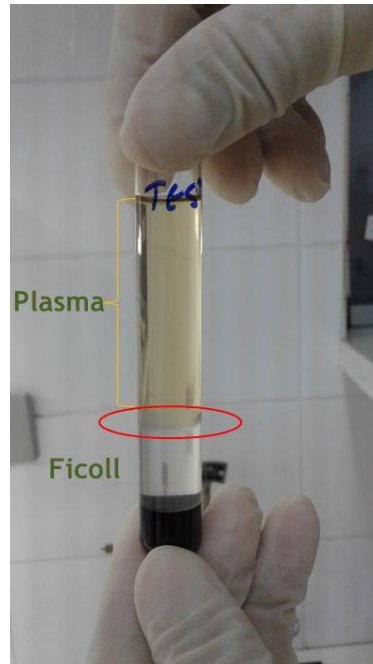
4.3 Protocolo de separação das células mononucleares

A purificação de células foi feita no sangue total proveniente de sangue humano, a partir da separação por gradiente de densidade em solução *Ficoll – Hypaque*, obedecendo ao protocolo descrito a seguir. Após a separação com o reagente *Ficoll*, o sangue foi diluído em PBS na proporção de 1:3. Logo em seguida foi realizada a centrifugação (1500rpm, por 25 min a 22°C).

As células mononucleadas do sangue periférico formam um anel, assim como destacado na Figura 10 onde há predominância de linfócitos, pelo qual é obtido um

concentrado de linfócitos totais, como apresentado. Essas células foram novamente centrifugadas (2000 rpm, por 5 min, a 4°C) e o *pellet* contendo os linfócitos foram homogeneizados para uma nova centrifugação.

Figura 10. Separação celular por gradiente de densidade



Fonte: autora, 2019.

4.4 Construção do biosensor eletroquímico a partir da deposição de células

A primeira etapa de deposição das células sobre a superfície do eletrodo foi realizada de forma direta, onde 5 μ L da solução contendo linfócitos totais foram colocados na área física do eletrodo de trabalho. A adsorção foi testada diversas vezes na faixa de 15 a 60 min na superfície do eletrodo. O segundo passo foi a diluição da solução concentrada de células para verificar a menor quantidade na qual o eletrodo apresentaria uma resposta satisfatória. Considerando que as células linfocitárias não são homogêneas em tamanho e quantidade no sangue, sua distribuição na superfície do eletrodo deve ser irregular e podem ser adsorvidas para formar aglomerados ou múltiplas camadas.

O número de células no eletrodo depende da quantidade de adsorção disponível. Assim, o processo de diluição baseado no cálculo foi realizado para determinar o número de células disponíveis para adsorção na superfície do eletrodo. Para obter a população de linfócitos na superfície do eletrodo, os valores teóricos de tamanhos e quantidades de linfócitos já disponíveis na literatura foram utilizados

com diâmetros de linfócitos (DL) de 7-20 μm (Abbas et al., 2007). Usando esses dados, calculou-se a média geométrica da área dos linfócitos. O número mínimo de células por área de eletrodo foi obtido usando a correlação de áreas. A correlação matemática foi a área do eletrodo ($D_e = 2 \text{ mm}$) / área geométrica média dos linfócitos.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados na solução concentrada (5 μL) e nas diluições obtidas a partir de 5 μL (42.450 células) para os volumes finais de 10, 50, 100 e 150 μL . Cálculos do número de células para as diluições foram 28.300, 14.150, 2.830 e 1.415, respectivamente

4.5 Obtenção de amostras de soro controle positivo em células humanas, soro controle negativo e complemento em células de coelho

As amostras de soro controle negativo utilizados foram constituídas de soro humano de homem, tipo sanguíneo AB (marca: Sigma-aldrich). As Amostras de soro controle positivo, concedidos pelo Laboratório- Lib, foram constituídas a partir de um “pool” de soros de pacientes hipersensibilizados contra moléculas HLA presentes em uma população. E o complemento foi obtido a partir de complemento de coelho da marca (marca: Sigma-aldrich).

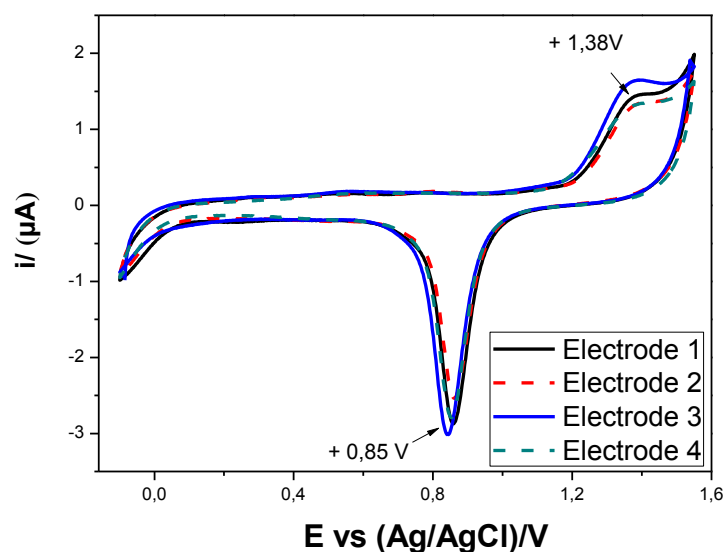
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de trabalho

Resultados de voltametrias cíclicas, no padrão de eletrodo de ouro foram avaliados em função da carga de redução (Figura 11). Os voltamogramas foram obtidos em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Na varredura direta e reversa em potenciais, variado de $-0,2$ a $1,55 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (MANUNU ET AL., 2004).

Estudos realizados demonstraram que os voltamogramas com eletrodos de ouro em meio ácido apresentam potencial de pico anódico, E_{pa} , e potencial de pico catódico, E_{pc} , características devido à adsorção do oxigênio no (E_{pa}) e sua desorção no, E_{pc} sobre a superfície do eletrodo de ouro (Au), como apresentado na Figura 1. Para todos os eletrodos confeccionados observaram-se as correntes de pico anódicas (i_{pa}) no potencial, $E_{pa} = +1,38 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, correspondentes a oxidação e correntes de pico catódicas (i_{pc}) em potencial $E_{pc} = +0,85 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, nos voltamogramas obtidos. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura (WANG ET AL., 2013; WALTER, ET AL. 2016).

Figura 11. Eletrodo de trabalho limpo eletroquimicamente, varredura de potencial, de $-0,2$ a $1,55 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, velocidade de varredura 250 mV s^{-1} , em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, comparação da terceira varredura de quatro eletrodos diferentes



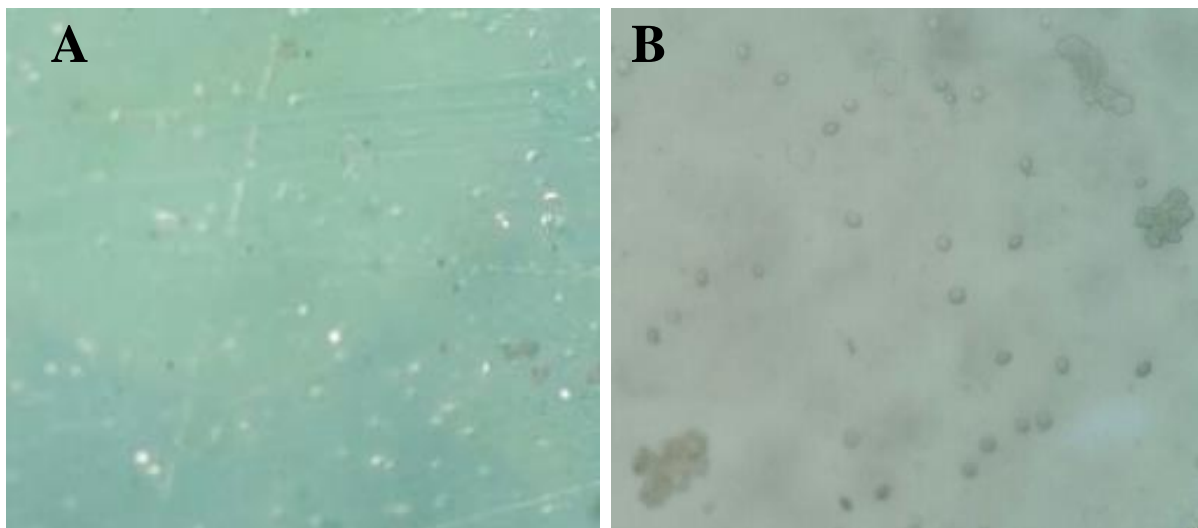
O voltamograma de ouro limpo obtido pelo eletrodo construído apresentou as mesmas características encontradas na literatura para todos os eletrodos de ouro policristalinos, possuindo áreas geométricas semelhantes ($3,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$) e área eletroquímica entre ($3,0$ a $4,0 \times 10^{-6} \text{ C}$), comprovando que o ouro da superfície transdutora do eletrodo, na varredura de oxidação, não apresenta correntes anódicas faradaicas, na faixa de potencial de $-0,2$ a $0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Em se tratando da varredura reversa foi observado processo de redução bem definido referente à redução do óxido de ouro, na superfície transdutora nesse eletrodo, livre de impurezas (STEVEN ET AL., 2016).

Após a etapa de limpeza em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, o eletrodo foi lavado com água pura ($18,2 \text{ M}\Omega$) e seco em atmosfera de nitrogênio para posterior deposição das células.

5.2 Deposição de células sobre a superfície do eletrodo (E_{Au})

Utilizando as diversas diluições foram depositados em cada caso $5 \mu\text{L}$ de solução de células nas concentrações previamente definidas. Na Figura 12 apresentamos a comparação da superfície do eletrodo limpo e com as células adsorvidas.

Figura 12. Imagem da superfície do eletrodo em microscópio óptico (A) superfície do eletrodo de ouro limpo e (B) células depositadas na superfície do eletrodo de ouro. Magnificação de (A) e (B) a $40\times$.



5.3 Estudo do tempo de adsorção de células sobre o eletrodo de trabalho(E_{Au})

Após o processo de adsorção celular no eletrodo E_{Au} , foi realizada a análise de voltametria cíclica. O intervalo de potencial escolhido foi na região onde o E_{Au} não apresentou reações (-0,2 a 0,8 V vs. Ag/AgCl/(KCl_{sat})). Inicialmente, a voltametria do eletrodo E_{Au} foi realizada na solução de PBS para verificar se eles tinham respostas eletroquímicas na faixa de potencial. Figura. 13 (A) (insert) mostra que processos faradaicos ocorrem nesta faixa de potencial, revelando que o eletrodo E_{Au} não possui atividade na solução PBS(Kim et al., 2017).

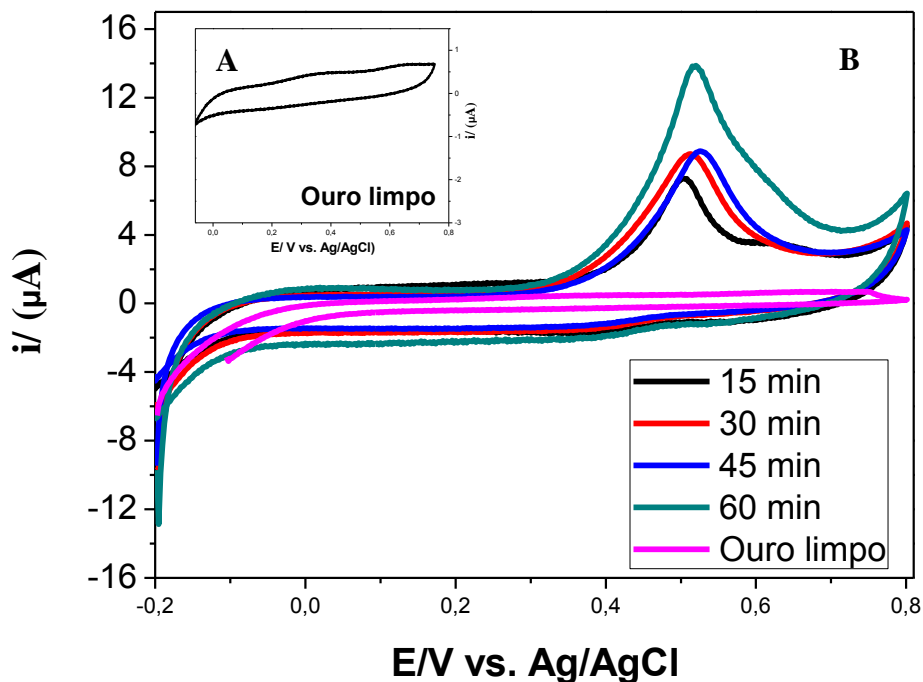
O estudo do tempo de adsorção foi realizado pela adição de 5 μ L de solução concentrada de linfócitos ao E_{Au} e variando o tempo. Os voltamogramas dos eletrodos de $E_{Au + Cell}$ foram obtidos (Figura 13B) para os tempos de adsorção de 15, 30, 45 e 60 minutos. Segundo Ahmed et al., 2017, a adsorção de moléculas como proteínas, DNA e RNA em substratos de ouro é um processo altamente reprodutível. Na literatura, muitos estudos examinaram a adsorção dessas diferentes amostras em superfícies de ouro (Koo et al., 2016; Sina et al., 2014; Yadav et al., 2016; Cheuquepan, 2017; Trišovic, 2015; Wang, 2014).). Considerando este princípio, em uma solução contendo resíduos de aminoácidos (átomos de nitrogênio e / ou enxofre) em contato com uma superfície de ouro, é esperada uma ligação covalente (Oliveira et al., 2015).

Na primeira voltametria realizada após o tempo de deposição celular de 15 min (Figura 13B), pode-se observar o pico de corrente anódica de 4,66 μ A a um potencial de aproximadamente 0,50 V vs. Ag/AgCl/(KCl_{sat}) na primeira curva de voltametria. A oxidação observada é irreversível. Este processo pode ser atribuído à oxidação de grupos amino, presentes na superfície das células HLA. Os grupos NH_2 podem ser facilmente oxidados e produzirem radicais $NH\cdot$. A ligação covalente (CN) é então formada pela reação de radical livre de NH com grupos de aminoácidos CO. (Hasazadeh, 2018) Para os outros tempos de adsorção, um aumento na corrente de pico anódico foi observado, com um aumento no tempo de contato de a solução celular com a superfície do E_{Au} , indicando um aumento de células na superfície a 30, 45 e 60 min.

A Figura 13 mostra que, a cada voltametria, foi observado um pico irreversível com o potencial de 0,50 + (0,01 ou 0,02) V vs. Ag/AgCl/(KCl_{sat}). As correntes de pico anódico dos voltamogramas em 15, 30, 45, 60 min foram I_{pas} 4,66 μ A, 6,78 μ A,

7,05 μA e 11,09 μA , respectivamente. Os valores de I_{pa} aumentaram, mas mostraram um desvio de linearidade. Este resultado é atribuído ao aumento da densidade e organização das células adsorvidas na superfície do eletrodo de ouro. A Tabela 1 apresenta os valores obtidos para os cálculos de área dos picos anódicos em cada um dos protocolos de voltametria nos pontos de tempo analisados.

Figura 13. (A) voltamograma cíclico do eletrodo de ouro em solução PBS; (B) eletrodo de ouro com células adsorvidas nos tempos de 15, 30, 45 e 60 min, em solução PBS, velocidade de varredura de 250 mV s^{-1} , no intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V vs. Ag/AgCl/(KCl_{sat}).



Os valores das áreas dos picos anódicos não podem ser representados em um gráfico linear, indicando a possível influência na adsorção devido aos tamanhos e tipos celulares; além disso, os íons estavam presentes na solução. Por outro lado, como a resposta aos 15 min tem um valor de área na mesma década (10^{-7} C) que nas outras vezes e devido à necessidade das respostas rápidas dos testes, este tempo de adsorção foi o utilizado na diluição.

Tabela 1. Áreas dos picos de corrente obtidos nos voltamogramas resultantes em diferentes tempos de adsorção das células sobre a superfície do eletrodo de ouro. Varredura de potencial entre -0,2 e 0,80 V, velocidade de varredura a 250 mV s⁻¹

Tempo de adsorção	Área do pico (C)
15 min	3,74x10 ⁻⁷
30 min	8,93 x10 ⁻⁷
45 min	9,00 x10 ⁻⁷
60min	13,9 x10 ⁻⁷

5.4 Estudo da concentração de células sobre o eletrodo de trabalho (E_{Au})

Após a análise do tempo de adsorção, a diluição celular foi realizada em relação à adsorção no eletrodo. A diluição foi feita com o objetivo de avaliar a proporção adequada de células que poderiam ser adsorvidas na superfície do eletrodo de ouro.

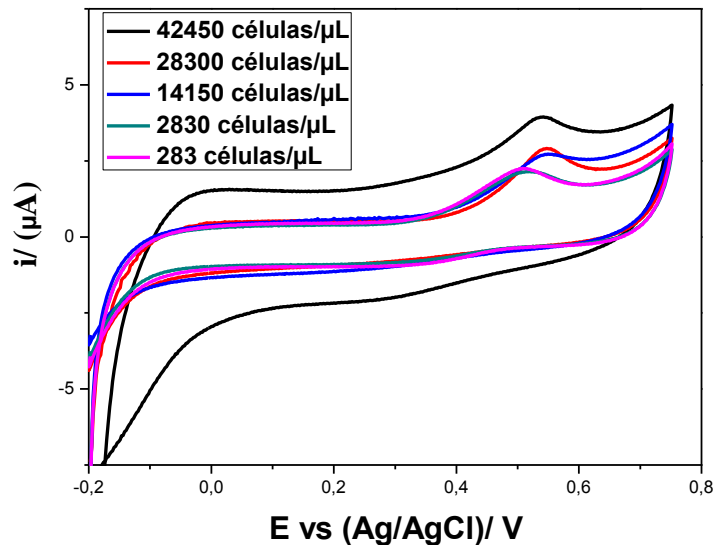
As amostras de células recebidas mostraram em seu rótulo a concentração de células por mililitro. Diluições foram realizadas usando este valor.

A observação das respostas eletroquímicas de E_{Au + Cell} nas várias diluições revelou que o número de células não é o único fator a determinar a adsorção. Parâmetros físico-químicos das substâncias expostas na superfície das células e íons presentes na solução estão envolvidos.

A Figura 14 mostra os voltamogramas para as diluições feitas a partir de 5 µL do volume inicial da amostra de células em tampão PBS para obter volumes de 10, 50, 100 e 150 µL. Essas diluições da amostra inicial permitiram o cálculo do número de células presentes em cada volume de 28.300, 14.150, 2.830 e 283 células, respectivamente.

De acordo com os dados obtidos a partir da voltametria cíclica, foram observados picos de oxidação nos potenciais de 0,54, 0,54, 0,50 e 0,50 V vs. Ag/AgCl/ KCl_{sat}, respectivamente, para cada diluição, revelando que a diminuição do número de células na superfície do eletrodo muda o sinal atual I_{pa} para um potencial menos positivo. A diluição de 5 µL da amostra inicial para 100 ou 150 µL mostrou voltamogramas muito semelhantes, permitindo o desempenho de todas as experiências subsequentes a uma diluição de 150 µL.

Figura 14. Voltamogramas da adsorção de células para as diluições realizadas com um tempo de adsorção na superfície do eletrodo por 15 min. Eletrodo de ouro com células adsorvidas, em solução PBS, velocidade de varredura de 250 mV s^{-1} , no intervalo de potencial de $-0,2$ a $0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl sat.}$



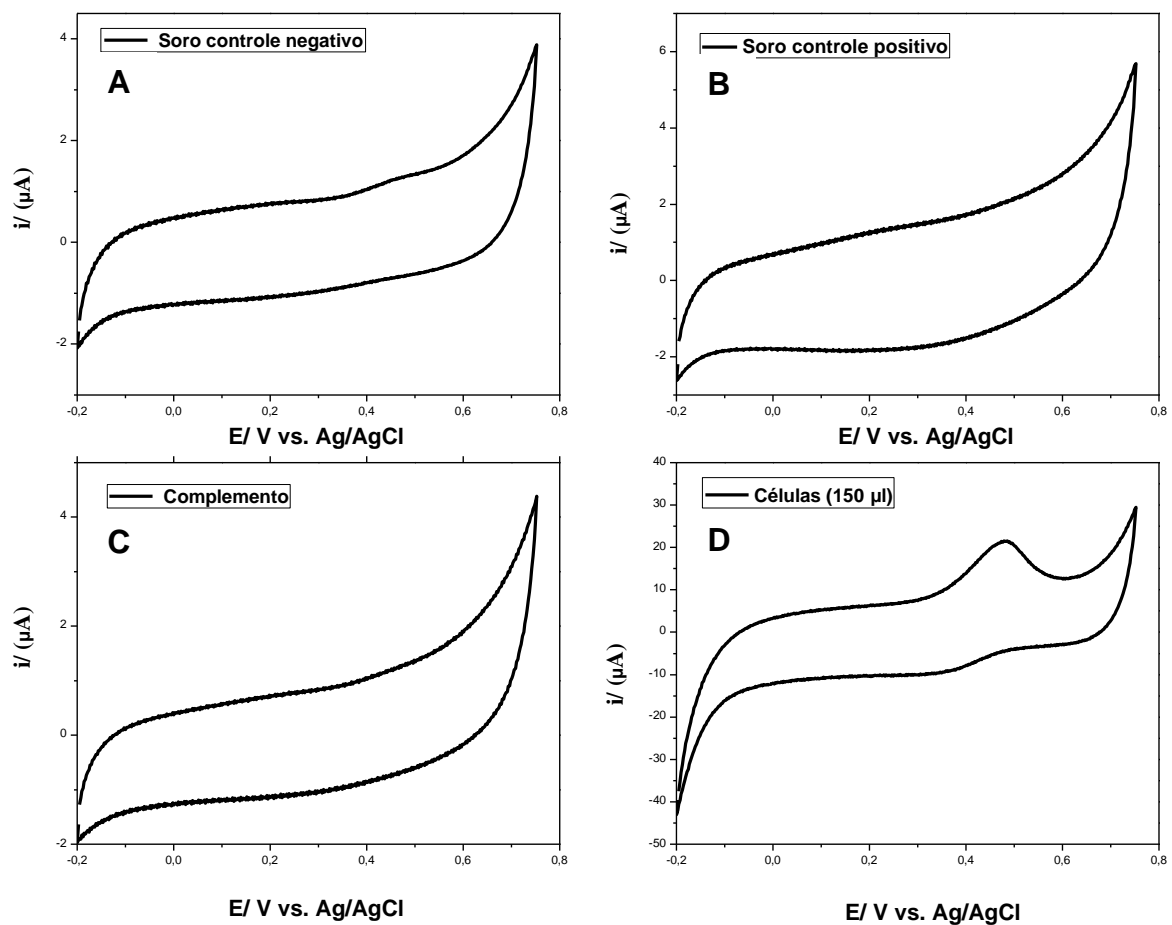
5.5 Medidas de voltametrias para as diferentes amostras de soros, positivo e negativo e para o complemento.

Os materiais, soros e complementos, utilizados na determinação de atividades interativas entre células, soros e complementos, foram testados para determinar quais respostas eletroquímicas, por voltametria cíclica, poderiam apresentar, sob o eletrodo ouro limpo. Na Figura 15 está apresentada a resposta eletroquímica 15(A) do soro controle negativo, 15(B) soro controle positivo e 15(C) complemento. Nas condições: presença do eletrodo de ouro em solução PBS; no intervalo de potencial $-0,2$ a $0,75 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl sat.}$; velocidade de varredura de 250 mV/s . O voltamograma obtido para o soro controle negativo, para o soro controle positivo e para o complemento não apresentaram quaisquer correntes faradaicas (oxidação/redução), indicando a ausência de interação dos soros e do complemento com o eletrodo.

Por outro lado, pode-se observar que a dupla camada, nos voltamogramas, apresentam diferentes áreas capacitivas para soro negativo, Figura 15 A, e soro positivo Figura 15 B, neste ultimo apresentando uma área de voltamograma maior

que a de soro negativo, onde pode-se atribuir a presença de substâncias (anticorpos) que sofrem efeito de polarização no intervalo de potencial.

Figura 15. Voltamogramas resultantes (A) amostra – 5 μL de soro controle positivo no eletrodo de trabalho limpo de Au, (B) amostra – 5 μL de soro controle negativo no eletrodo de trabalho limpo de Au, (C) amostra de complemento – 5 μL no eletrodo de trabalho limpo de Au e (D) solução diluída de células (42450 células). 3 varreduras com potencial variando entre -0,2 e 0,75V, velocidade de varredura de 250 mV s^{-1}



As respostas das voltametrias de soro positivo, negativo e complemento foram comparadas com a da voltametria da diluição de linfócitos para a menor quantidade de células (diluição 5 μL para 150 μL) e o tempo de adsorção de 15 min. As amostras de células, de acordo com a Figura 15(D), apresenta um pico de oxidação definido em 0,50 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat.}, enquanto para as outras amostras, soro positivo e negativo e complemento, nenhum pico foi observado.

5.6 Análises voltamétricas para o cruzamento das diferentes amostras

A partir da voltametria obtida para os soros controle (positivo e negativo) e complemento, foram realizados testes equivalentes a um crossmatch, ou seja, as amostras foram misturadas e submetidas à polarização em ciclo de voltametria com $E_{Au + Cell}$. As Figuras 16C e 16D mostram voltametria cíclica realizada em amostras contendo: (a) soro de controle negativo e células; e (b) soro controle positivo e células.

Na Figura 16C e 16E, voltamogramas de $E_{Au + Cell}$ com soro negativo e $E_{Au + Cell}$ com soro negativo e complemento mostraram muito pouco ou nenhum processo oxidativo comparado ao $E_{Au + Cell}$ isolado. Esse comportamento foi atribuído à remoção de células E_{Au} por íons cloreto presentes no soro (HAN, 2018). O soro negativo foi testado para a presença de cloretos (Figura 17). Os anticorpos eram não reativos, o que facilitou a ação dos cloretos nas células HLA, como demonstrado na Figura 18, das amostras, obtidas em microscópio óptico.

Na Figura 16D, um voltamograma de $E_{Au + Cell}$ com soro positivo pode ser observado como uma resposta eletroquímica no potencial aproximado de 0,50 V vs. Ag/AgCl/ sat. KCl, com a área do pico anódico de $7,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$, valor aproximado ao encontrado para $E_{Au + Cell}$. A Figura 16F mostra o voltamograma obtido para o cruzamento de amostras de soro controle positivo/células/complemento e uma voltametria cíclica com pico de oxidação no potencial 0,52 V vs. Ag / AgCl / sat. KCl, com área de $9,19 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$ e o aumento de toda a região de dupla camada da curva de voltametria, diferem do voltamograma obtido para soro controle negativo/células/complemento.

Estes resultados observados na Figura 16C-16F mostram uma distinção entre as análises de $E_{Au + Cell}$ com amostras de soro controle positivo/ células e de soro controle negativo/ células à medida que o sinal de corrente no soro positivo é amplificado. Os resultados da análise eletroquímica de amostras de soro positivas e negativas e complemento utilizando $E_{Au + Cell}$ são indicadores qualitativos das reações entre os anticorpos e antígenos HLA específicos presentes na superfície celular, e podem ser utilizados para as análises qualitativas de CF e CDC. No entanto, os testes de voltametria são mais rápidos e podem ser medidos qualitativamente.

Figura 16. Análises voltamétricas das soluções (A) solução de 5 μL de soro controle negativo e complemento sobre o eletrodo de ouro limpo, (B) solução de 5 μL de soro controle positivo e complemento, (C) solução de 5 μL de soro negativo e células, (D) solução de 5 μL de soro positivo e células, (E) solução de 5 μL de células diluídas, soro controle negativo e complemento (5 μL :1 μL : 4 μL) e (F) amostra de 5 μL de células, soro controle positivo e complemento (5 μL :1 μL : 4 μL) sobre o eletrodo de ouro limpo, na faixa de potencial -0,2 a 1,55V, 3 varreduras a 250mV s⁻¹

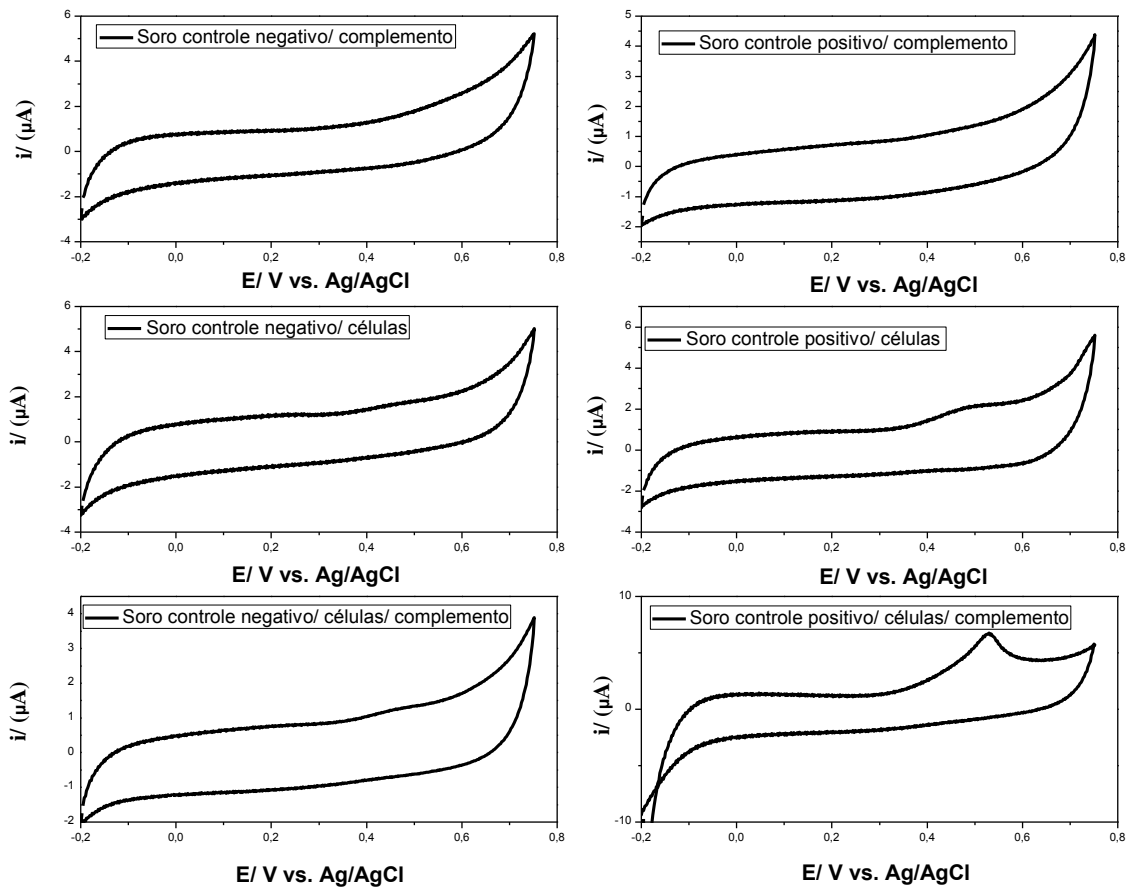
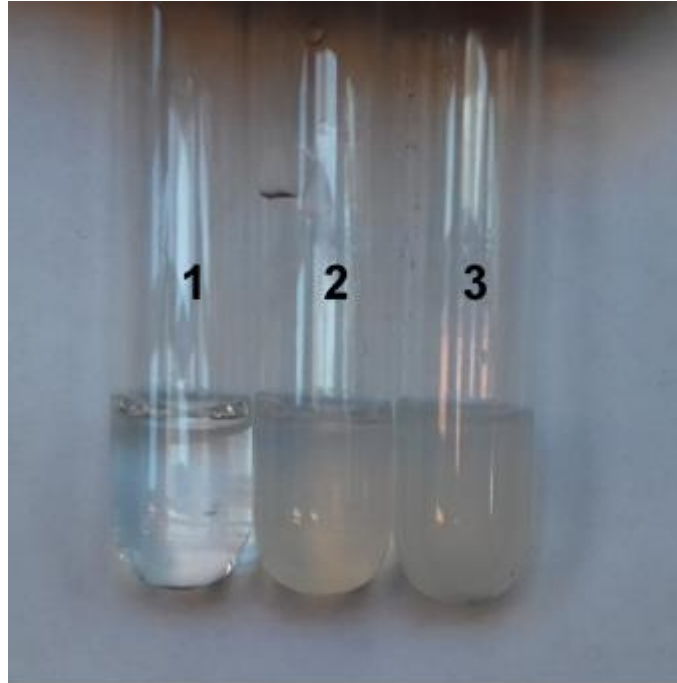
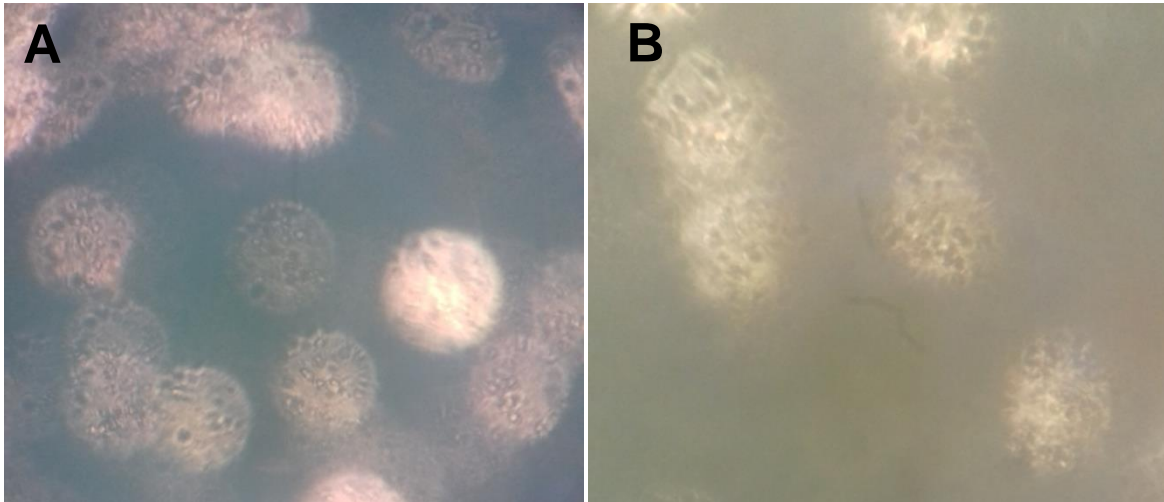


Figura 17. Identificação Teste de íons cloreto em amostras de soro humano com solução de nitrato de prata (AgNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$).



No tubo 1, contendo amostra de 1 mL de água ultrapura e solução de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 , deve-se notar que há formação de precipitado, devido à ausência de íons cloreto (Cl^-) da água. No tubo 2 contendo 1 mL de água e $10 \mu\text{L}$ de solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $10 \mu\text{L}$ de solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Neste caso ocorre a formação de precipitado de AgCl , a coloração branca do precipitado é observada pela turbidez da amostra. Finalmente, no Tubo 3, com 1 mL de água ultrapura, $10 \mu\text{l}$ de amostra de soro humano e $10 \mu\text{L}$ de solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, a solução, após a adição de AgNO_3 , apresentou cor branca com formação de precipitado de AgCl . O teste realizado indica a presença de íons Cl^- na amostra de soro humano.

Figura 18. Imagem da superfície do eletrodo no microscópio óptico (A) superfície do eletrodo de ouro com células e controle positivo do soro (B) superfície do eletrodo de ouro com células e soro controle negativo; ampliação (A) e (B), 40x.



5.7. Análise voltamétrica das amostras de beads magnéticas utilizadas em separação por crossmatch

Para realizar as análises de linfócitos B e T foram utilizadas as Beads B e T, sistema magnético com o anticorpo monoclonal, anti-CD19 e anti-CD3 respectivamente. As beads magnéticas se ligam aos linfócitos permitindo a separação destes dos demais, em cada caso B ou T através de campo magnético (ímã). Uma vez obtido as beads B ou T com os linfócitos B ou T conforme a aquisição, cada um deles foi submetido à análise por voltametria. No entanto antes de realizar os experimentos com as beads + linfócito foi seguido o protocolo: a) medidas de voltametria do eletrodo limpo em solução PBS; b) medidas de voltametria do eletrodo com as beads em solução PBS; e c) medidas de voltametria das beads + linfócitos em solução PBS.

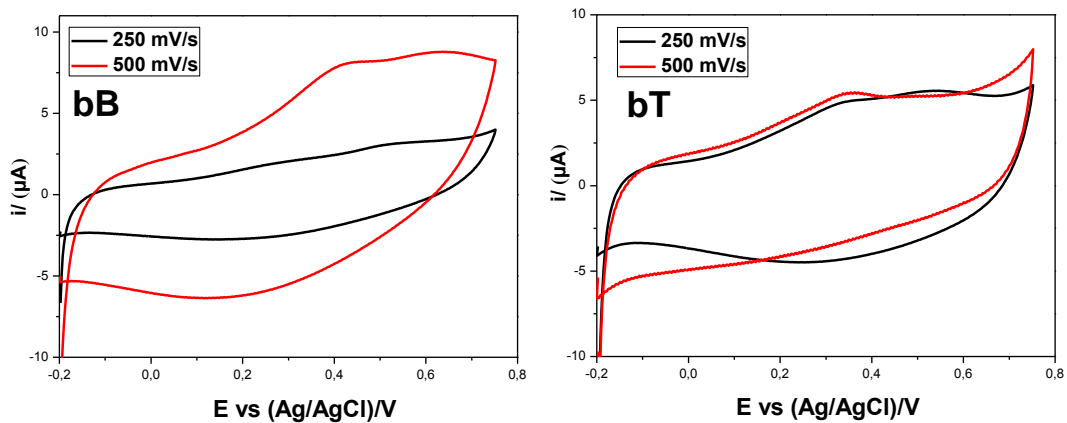
As medidas com E_{Au} limpo em solução PBS no intervalo de potencial -0,2 a +0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, não apresenta nenhuma corrente faradaica como nos outros experimentos realizados neste trabalho.

Para as beads sem acoplamento com os linfócitos (Figura 19 bB e bT) os voltamogramas obtidos em velocidades de varreduras diferentes (0,25 e 0,50 V), no

mesmo intervalo de potencial já utilizado, mostra uma corrente faradaica, com pico no potencial 0,34 e 0,46 V para bead B e T respectivamente (SUGAWARA, 2017). Esse pico de corrente está associado ao processo de oxidação envolvendo terminal aminos de amino ácido.

Para as beads ligadas ao linfócito não foi possível obter voltamogramas distintos dos obtidos para beads em função do processo oxidativo dos linfócitos ocorrerem em potenciais que tornam indistinto a contribuição de cada oxidação, do linfócito e da beads.

Figura 19. Voltamogramas cíclicos das amostras de beads magnéticas com anticorpo monoclonal anti- CD19 e anti-CD3 sobre o eletrodo de ouro limpo, na faixa de potencial -0,2 a 0,8V, 3 varreduras a 250mV s⁻¹



6. CONCLUSÕES

A montagem dos eletrodos utilizando folha de poli-estireno, recoberta com ouro por técnica de “sputtering”, e fitas de cobre servindo de contato, mostrou ser um sistema de fácil execução e de baixo custo para realização do trabalho. As células se ligaram aos eletrodos de ouro por adsorção permitindo a avaliação do sinal de oxidação da superfície. O processo envolvido na adsorção das células sobre o eletrodo provavelmente se deve a interações de grupos, de nitrogênio e/ou de oxigênio, expostos na superfície da célula e essa adsorção pode ser removida pela presença do íon cloretos. As células adsorvidas na superfície do eletrodo de ouro apresentaram um pico de oxidação, em um processo irreversível, em aproximadamente 0,50 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat.}, quando se efetuou a varredura de potencial entre -0,2 e 0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat.}. As medidas elétricas (por voltametria) mostraram que os soros (positivo e negativo) e o complemento não apresentam sinais oxidação ou redução no intervalo de potencial medido (-0,2 a 0,8 V vs, Ag/AgCl/KCl_{sat.}). Quando os eletrodos com células e soro positivo foi submetido à varredura de potencial no intervalo (-0,2 a 0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat.}), apresentou o sinal de corrente amplificado, no potencial de oxidação das células (0,50 V), provavelmente devido a interação de substâncias (anticorpos) do soro positivo com elementos da células.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S., 2007. Cellular and Molecular Immunology 6th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.

ABELLÁN-LLOBREGAT, A.; JEERAPAN, I.; BANDODKAR, A.; VIDAL, L.; CANALS, A.; WANG, J.; VMORALLÓN, E. A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration. **Biosens. Bioelectron.** v. 91, p. 885–891, 2017.

AHMED, M.; CARRASCOSA, L.G.; SINA, A.A.I.; ZARATE, E.M.; KORBIE, D.J.; RU, K.; TRAU, M. Detection of aberrant protein phosphorylation in cancer using direct gold-protein affinity interactions. *Biosensors and Bioelectronics*, v.91, p. 8–14, 2017.

ALFAYA, A. S.; KUBOTA, L. A utilização de materiais obtidos pelo processo de Sol-Gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v.25, p. 835–841, 2008

ALHEIM M.; PAUL P.K.; HAUZENBERGER DM. Improved flow cytometry based cytotoxicity and binding assay for clinical antibody HLA crossmatching. *Hum Immunol.*;v. 76, n. 11, p. 849-57, 2015.

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes - RBT. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro / Junho. 2015. RBT. 2015; 21(1):1-29.

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes - RBT. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro / Setembro. 2017. RBT. 2015; 21(1):1-29.

BARD, A.J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: fundamentals and applications*, 2ed, John Willey and Sons Inc, New York, 2001.

BETHESDA, M.D. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual Framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* v.69, p. 89-95, 2001. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989.

KRAJEWSKA, B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 22–40, 2009.

BILLAH, M.M.; HODGES, C.S.; HAYS, H.C.W. Millner. Directed immobilization of reduced antibody fragments onto a novel SAM on gold for myoglobin impedance immunosensing, *Bioelectrochemistry*, v. 80, n.1, pp. 49-54, 2010.

BONA, C.; ANTEUNIS, A.; ROBINEAUX. R.; HALPERN, B. Structure of the Lymphocyte Membran. III. Chemical Nature Of The Guinea-Pig Lymphocyte Membrane Macromolecules Reacting With Heterologous Als, *Clin. Exp. Immunol.* v.12, p. 377-390, 1972.

BONROY, K.; FREDERIX, F.; REEKMANS G.; DEWOLF, E.; BORGHS, G. DECLERCK, P.; GODDEERIS, B. Comparison of random and oriented immobilization of mixed selfassembled monolayers, *J. Immunol. Methods*, v. 312, n.1, p. 167–181, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. DATASUS. Indicadores de Morbidade. Prevalência de pacientes em diálise SUS - Brasil. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.600, de 21 de Outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil [Internet]. [citado 2017 Ju 24]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. Electrochemical sensing in solution-origins, applications and future perspectives. *J. Solid State Electrochem.*, v. 15, pp. 1487-1494, 2011.

BROTTON, S. J.; KAISER, R. L. Novel high-temperature and pressure-compatible ultrasonic levitator apparatus coupled to Raman and Fourier transform infrared spectrometers. *Rev. Sci. Instrum.* v.84, p.055114, 2013 doi: 10.1063/1.4804647.

CAI, X., XING, X.; CAI, J.; CHEN, J.; WU, S.; HUANG, F. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study, *Micron.* v.41, p. 257–262, 2010. doi:10.1016/j.micron.2009.08.011

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; COSTA-GARCÍA, A Competitive enzyme immunosensor developed on a renewable carbon paste electrode support, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 119–127

CHEN, Y.; ANDERSSON, A.; MECKLENBURGD, M.; XIEB, B.; ZHOUA, Y. Dual-signal analysis eliminates requirement for milk sample pretreatment. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 29, p.115– 118, 2013.

CHOTHIA, C.; LESK, A.M. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901–917, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90412-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(87)90412-8).

CHEUQUEPÁN, W.; MARTÍNEZ-OLIVARES, J.; RODES, A., & ORTS, J.M.. Squaric acid adsorption and oxidation at gold and platinum electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2017.

CORTÈS S.; VILLIERS C. L.; COLPO P.; COUDERC R.; BRAKHA C.; ROSSI F.; MARCHE P. N, VILLIERS M. B. Biosensor for direct cell detection, quantification and analysis. *Biosens Bioelectron.* V.15;n. 26, p. :4162-8. doi: 10.1016/j.bios.2011.04.016.

D'ORAZIO, P. *Chimica ACTA*, v.334, n. 41, 2003.

DEMIR, E.; YEĞİT, O.; EROL, A.; AKGÜL, S.U.; ÇALIŞKAN, B.; BAYRAKTAR, A.; ÇALIŞKAN, Y.; TÜRKMEN, A.; SAVRAN, F.O.; SEVER, M.S. Relevance of Flow Cytometric Auto-Crossmatch to the Post-transplant Course of Kidney Transplant Recipients, *Transplantation Proceedings*, v. 49, n. 3, 2017, p. 477-480, 2017. ISSN 0041-1345,

DI, J.; BI, S.; ZHANG, M. Third Generation-superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol-gel thin film in gold electrode. *Biosensors and bioelectronics*. V. 19, n. 11, p. 1479- 86, 2004.

DING, C.F.; ZHAO, F.; ZHANG, M.L.; ZHANG, S.S.. Hybridization biosensor using 2,9-dimethyl-1,10-phenantroline cobalt as electrochemical indicator for detection of hepatitis B virus DNA *Bioelectrochemistry*, v.72, n. 1, pp. 28-33, 2008.

DINH, V.T; CULLUM B. *Biosensors and biochips: advances in biological and*

ENDO, T.; YANAGIDA, Y.; HATSUZAWA, T. Quantitative determination of hydrogen peroxide using polymer coated Ag nanoparticles. *Measurement*, v. 41, p. 1045–1053, 2008.

FAN X.; WHITE I.M.; SHOPOVA S.I.; ZHU H.; SUTER J.D.; SUN Y.: Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Anal. Chim. Acta.*, v. 620, P. 8–16, 2008.

GARCIA VD, PESTANA JOM, IANHEZ LE. História dos transplantes no Brasil. In: Garcia VD, Abbud-Filho M, Neumann J, Pestana JOM, editors. *Transplante de órgãos e tecidos*. 2a ed. São Paulo: Segmento Pharma; 2006. p. 27-42.

GARCIA VD. Editorial. *RBT Registro Brasileiro de Transplantes*. 2009;15(3):3. Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXV_n3/index.aspx?idCategoria=2. Acessado em 2010 (14 abr).

GARAVOY, M. R. et. al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc.*, United States, v. 15, p. 1939, 1983.

GARCINUÑO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; PÉREZ-CONDE, C.; GUTIÉRREZ, A.M.; CÁMARA, C. Development of a fluoroimmunosensor for theophylline using immobilised antibody, *Talanta*, v. 52,p. 825–832, 2000.

GERARD, M.; CHAUBEYB, A. ; B, MALHOTRAB D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. v 17, n . 5 , p. 345–359, May 2002.

GESCHWINDNER S.; CARLSSON J.F.; KNECHT W.: Application of Optical Biosensors in Small-Molecule Screening Activities. *Sensors*. v. 12, p. 4311–4323, 2012.

GIANNETTO, M.; MATTAROZZI, M.; UMILTÀ, E.; MANFREDI A.; QUAGLIA, S.; CARERI, M. An amperometric immunosensor for diagnosis of celiac disease based on covalent immobilization of open conformation tissue transglutaminase for

determination of anti-tTG antibodies in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 62, p. 325–330, 2014.

GORODKIEWICZ E., REGULSKA E., ROSZKOWSKA-JAKIMIEC W. Determination of the active form concentration of cathepsin D and B by SPRI biosensor, *Journal of Laboratory diagnostics*. v. 46, p. 107–109, 2010.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOEROES, J.; REIMHULT, E.. *Sensors*, v. 8, n.3, p.1400-58, 2008.

GUILLAUME, N.; MAZOUZ H.; PIOT V. Correlation between Luminex donor-specific crossmatches and levels of donor-specific antibodies in pretransplantation screening. *Tissue Antigens*, v.82, p.16-20, 2013.

GURALPA, S A.; GUBBUKB, I. H.; KUCUKKOLBASIB, S.; GULARIA, E. Universal cell capture by immobilized antimicrobial peptide plantaricin. *Biochemical Engineering Journal*, v. 101, p.18–22, 2015.

HAN, L., YAN, B., ZHANG, L., WU, M., WANG, J., HUANG, J., DENG, Y., ZENG, H. Tuning protein adsorption on charged polyelectrolyte brushes via salinity adjustment. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. v.539, p.37-45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.12.004>.

H. NAKAMURA, I. KARUBE, *ANAL. Bional. Chem*, v.377, p.446–468, 2003.
HARBOE, N.; INGILD, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre, *Scand. J. Immunol.* 2 (1973) 161–164, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.1973.tb03798.x>. [64]

JIANG, X.; LI, D.; XIA, X.; YING, Y.; LI, Y.; Y, Z.; WANG, J. Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, p.1577–1587, 2008.

JUNG, Y.; JEONG, J., CHUNG, BONG. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst*, v.133, p. 697-701, 2008.

KANDIMALLA, V.; NEETA, N.; KARNATH, N.; THAKUR, M. ROSHINI, K.; RANI, B. A.; PASHA, A.; KARANTH, N.; *Biosensors and bioelectronics*. V.4, p.903-906, 2004.

KHASHAYAR, P.; AMOABEDINY, G.; LARIJANI, B., HOSSEINI, M.; VANFLETEREN, J. Fabrication and Verification of Conjugated AuNP-Antibody Nanoprobe for Sensitivity Improvement in Electrochemical Biosensors. *Sci Rep*, v. 7, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-12677-w.

KIM, A.R.; PARK, T.J.; KIM, M.S.; KIM, I.H.; KIM, K.S.; CHUNG, K.H.; KO, S. Functional fusion proteins and prevention of electrode fouling for a sensitive electrochemical immunosensor. *Analytica Chimica Acta*, 967, 70-77, 2017.

KOO, K.M.; CARRASCOSA, L.G.; SHIDDIKY, M.J.; TRAU, M.. *Anal. Chem.* 88 (4), 2000–2005, 2016b.

LAMB D. *Transplante de Órgãos e Ética*. Trad. Jorge Curbelo. São Paulo: Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos/Editora Hucitec, 2000.

LEI, C.X.; Gong F. C.; Shen, G.L., Yu, R.Q. Amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antigen using antibodies loaded on a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B*, v. 96, p. 582–588, 2003

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; O'KENNEDY, R. *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 1, p 3-13, 2003.

LEQUIN, R. M. *Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, *Clinical Chemistry*, vol. 51, pp. 2415-2418, march, 2005.

LIN, J.; JU. H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, p. 1461–1470, 2005.

LIU, G.D.; WU, Z.Y.; WANG, S.P.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. Renewable amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antibody assay, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3219–3226.

LIU, Y. T.; DENG, J.; XIAO, X.L.; DING, Y.L.; YUAN, H.; LI, X.T.; LI, X.N.; YAN, L.L. WANG. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. *Electrochimica Acta*, v.56,n.12, p. 4595, 2011

LUPPA, P.B., SOKOLL, L.J. , CHAN, D.W. *Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry*. *Clin. Chim. Acta*, v. 314, pp. 1-26, 2001.

MACGILLIVRAY, R.T.A.; KANDEMIR, B.; BOU-ABDALLAH, F.; 2009. *J. Mol. Recognit.* 22,p. 521–529.

MAIGA, M.; YAZGAN, A.; KARIUKI, V. M.; DEMIRKO, O. D.; SADIK, O. A. Brilliant green sequestered poly(amic) acid film for dual-mode detection: Fluorescence and electrochemical enzymatic biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. V. 256, p.71-78, 2018.

MCDONALD, G. D.; STORRIE-LOMBARDI, M. C. *Biochemical Constraints in a Protobiotic Earth Devoid of Basic Amino Acids: The “BAA(-) World”*. *Astrobiology*. v.10, p.989-1000, 2010. DOI: 10.1089/ast.2010.0484

MATYSIK, J.; SCHULTEN, E.; ALIA; GAST, P.; RAAP, J.; LUGTENBURG, J.; HOFF, A. J.; GROOT, H. J. M. *Photo-CIDNP ¹³C Magic Angle Spinning NMR on Bacterial Reaction Centres: Exploring the Electronic Structure of the Special Pair and Its Surroundings*. *Biol. Chem.*, v.382, p.1271 – 1276, 2001.

WANUNU, M.; VASKEVICH, A.; RUBINSTEIN, I. Widely-applicable gold substrate for the study of ultrathin overlayers. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.17, 5569-5576, 2004.

LO D. J.; KAPLAN, B.; KIRK, A. D. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 215–22. published online 21 January 2014; doi:10.1038/nrneph.2013.281, 2014

MASON, A.B.; BYRNE, S.L.; EVERSE, S.J.; ROBERTS, S.E.; CHASTEEN, N.D.; SMITH, V.C.; MACGILLIVRAY, R.T.A.; KANDEMIR, B.; BOU-ABDALLAH, F. J. *Mol. Recognit.* v. 22,p. 521–529, 2009.

MCGOVERN, J.P.; SHIH, W. Y.; REST, R.; PUROHIT, M.; PANDYAC, Y.; SHIHD, W. H. Label-free flow-enhanced specific detection of *Bacillus anthracis* using a piezoelectric microcantilever sensor. *Analyst*, v. 133, p. 649–654, 2008.

MCGRATH, T. F.; ANDERSSON, K.; CAMPBELL, K.; FODEY, T.L.; ELLIOTT, C. T. Development of rapid low cost fluorescent biosensor for the detection of food contaminants. *Biosensors and bioelectronics*. v.41;p. 96-102, 2013. *medical diagnostics. Fresen J Anal Chem* 2000;366(6–7):540–51.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences*, v.20, p.1113-1126, 2004.

MONOŠÍK R.; STRED'ANSKÝ M.; ŠTURDÍK E. Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis, *J. Clin. Lab. Anal.* v. 26, n.1, p. 22–34, 2012.

MORRIS, R.I.; MULLER, S.; PRUIJN, G.J.; VAN VENROOIJ, W.J.; SMOLEN, J.S., BROWN, P.O., STEINMAN, L., Utz, P.J., 2002. *Nat. Med.* 8, 295–301

MOURA-MELO, S.; MIRANDA-CASTRO, R.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; DOS SANTOS JUNIOR, J.R.; DA SILVA FONSECA, R.A.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J. A Quantitative PCR-Electrochemical Genosensor Test for the Screening of Biotech Crops. *Sensors*, 17(4), 881, 2017.

NANKIVELL, B. J.; ALEXANDER, S. I. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med.* v. 363, p.1451-1462, 2010.

PEREIRA, W A. História dos Transplantes. In Pereira, W A . *Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

OLIVEIRA, A.A.S.; COSTA, D.A.S.; TEIXEIRA, I.F.; MOURA, F.C.C.. Gold nanoparticles supported on modified red mud for biphasic oxidation of sulfur compounds: A synergistic effect *Appl. Catal. B. Environ.* v.162, p.475–482, 2015.

PARK, J.; LIN, H.Y.; ASSAKER, J.P.; JEONG, S.; HUANG, C.H.; KURDI, A. Integrated kidney exosome analysis (iKEA) for the detection of kidney transplant rejection. *ACS Nano.* v.11, p.11041–11046, 2014. <http://doi:10.1021/acsnano.7b05083>.

PATEL, R.; TERASAKI, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* v.280, p.735-739, 1969. DOI: 10.1056/NEJM196904032801401.

PICASCIA, A.; INFANTE, T.; NAPOLI, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clin. Exp. Nephrol.* v.16, p.373-381, 2012. DOI: 10.1007/s10157-012-0635-1.

ROELEN, D.L.; DOXIADIS, I.I.; CLAAS, F.H.. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. *Transpl. Int.* v.25, p.604-610, 2012. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2012.01491.x.

SANTIAGO, J. L. M. Determinação de testosterona em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de ouro de baixo custo modificado com polianilina e nanopartículas de ouro. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Piauí.

SHAH, S.L. Hematological changes in Tinca tinca after exposure to lethal and sublethal doses of mercury, cadmium and lead. *J. Fish. Sci.* v.9, p.434–443, 2010. DOI: <http://aquaticcommons.org/id/eprint/22388>.

SINA, A.A.I.; HOWELL, S.; CARRASCOSA, L.G.; RAUF, S., SHIDDIKY, M.J.; TRAU, M. eMethylsorb: electrochemical quantification of DNA methylation at CpG resolution using DNA-gold affinity interactions. *Chem. Commun. (Camb).* v.50, p.13153–13156, 2014. DOI: 10.1039/c4cc06732k.

SOLEZ, K.; COLVIN, R.B.; RACUSEN, L.C.; HAAS, M.; SIS, B.; MENGEL, M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am. J. Transplant.* v. 8, p.753-760, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x.

SRINIVAS, T.R.; MEIER-KRIESCHE, H.U. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* v.3, p.101-116, 2008. DOI: 10.2215/CJN.03510807.

STEVEN, J.T.; GOLOVKO, V.B.; JOHANNESSEN, B.; MARSHALL, A.T.. Electrochemical stability of carbon-supported gold nanoparticles in acidic electrolyte during cyclic voltammetry. *Electroch. Acta.* v.187, p.593-604, 2016. DOI 10.1016/j.electacta.2015.11.096.

TERASAKI, P.I.; MCCLELLAND, J.D. Micro droplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 204, 98-1000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14248725>.
Trišović, N.P., Božić, B.D., Lović, J.D., Vitnik, V.D., Vitnik, Ž.J., Petrović, S.D., et al., 2015. Electrochemical characterization of phenytoin and its derivatives on bare gold electrode. *Electroch. Acta.* v.161, p.378-387., 1964. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.114>.

SUGAWARA, K.; KURAMITZ, H.; SHINOHARA, H. Fabrication of micromagnetic beads with molecular recognition/ electron-transfer peptides for the sensing of ovalbumin. *Analytica Chimica Acta*, v.958, p. 30-37, 2017.

XU, X.; MAKARAVICIUTE, A.; PETTERSSON, J.; ZHANG, S.L. ; NYHOLM, L.; ZHANG, Z. Revisiting the Factors Influencing Gold Electrodes Prepared Using Cyclic Voltammetry, *Sensors and Actuators B*. v.18, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.008>.

WALTER, A.; LANGSCHWAGER, F.; MARKEN, F.; FLECHSIG, G.U. Nanostructured heated gold electrodes for DNA hybridization detection using enzyme labels. *Sens. Actuators B: Chem.* v.233, p.502-509, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.074>

WANG, G.; ZHOU, Y.; HUANG, F.J.; TANG, H.D.; XU, X.H.; LIU, J.J. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J. Proteome Res.* v.13, p.2649-2658, 2014. DOI: 10.1021/pr5000895.

WANUNU, M.; VASKEVICH, A.; RUBINSTEIN, I. Widely-Applicable Gold Substrate for the Study of Ultrathin Overlayers *J. Am. Chem. Soc.* v.126, p.5569-5576, 2004. DOI: 10.1021/ja0396448.

YADAV, S.; CARRASCOSA, L.G.; SINA, A.A.; SHIDDIKY, M.J.; HILL, M.M.; TRAU, M.. Electrochemical detection of protein glycosylation using lectin and protein-gold affinity interactions. *Analyst.* v.141, p.2356-2361, 2016. DOI: 10.1039/C6AN00528D.

ZHANG, J.; TING, B.P.; KHAN, M.; PEARCE, M.C.; YANG, Y.; GAO, Z.; YING, J.Y. Pt nanoparticle label-mediated deposition of Pt catalyst for ultrasensitive electrochemical immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* v.26, p.418-423, 2010. DOI: 10.1016/j.bios.2010.07.112.