UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LAÍS CANNIATTI BRAZACA

Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce
do diabetes *mellitus* tipo 2

São Carlos

2015

LAÍS CANNIATTI BRAZACA

Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce
do diabetes *mellitus* tipo 2

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida

(Versão original disponível na unidade que aloja o programa)

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Canniatti Brazaca, Laís
Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2 / Laís Canniatti Brazaca; orientador Valtencir Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
111 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Diabetes. 2. Adiponectina. 3. Biossensor. 4. Eletroquímica. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

Aos meus pais, César e Solange, e
aos meus avós, Theresa, Hélio, Amélia e Valentim,
por estarem sempre presentes e acreditando em mim.

Agradecimentos

Aos meus pais, Solange e César, pelo apoio durante toda a minha vida. Agradeço por sempre estarem comigo e por acreditarem em mim. Vocês são a base de minha formação. Tenho muito orgulho de ter vocês como pais.

Aos meus avós, Theresa, Hélio, Amélia e Valentim. Obrigada por ainda cuidarem de mim e por acreditarem plenamente em meu potencial.

À toda minha família, por estarem sempre ao meu lado e dispostos a ajudar.

Ao professor Valtencir Zucolotto, pela orientação e apoio durante o período de mestrado e de iniciação. Obrigada por todo auxílio na minha formação científica.

À FAPESP, ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro ao projeto.

À diretoria do Instituto de Física de São Carlos, pela concessão do prêmio de terceiro melhor projeto de mestrado na SIFSC 4.

Ao Bruno, à Juliana, à Camila e à Valéria, que foram essenciais na execução do projeto. Obrigada por estarem sempre disponíveis para me auxiliar e pelas boas discussões.

A todos os colegas e funcionários do GNano, pela ótima companhia e pelo apoio profissional e pessoal.

Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira e ao InCor, por cederem as amostras de plasma humano utilizadas na pesquisa.

À toda a “turma”, por serem minha segunda família e fonte de muita força – principalmente à Bruna, ao Felipe e ao Marcelo.

Aos meus amigos, Thomás, Ana Laura, Ilaiáli, Cristiane, Camila, Carolina, Érica, Bruno, Éverton, Laís, Raíssa. Por todas as jantas, encontros e conversas. Obrigada por fazerem o meu período em São Carlos muito melhor.

Aos colegas do time Brasil-SP do iGEM, pela companhia e pelos conhecimentos adquiridos nas mais diversas áreas: design, construção de sites, financeiro, comunicação e, por fim, biologia molecular.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá.

A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria,

de experiência e de competência.” (Henry Ford)

RESUMO

BRAZACA, L.C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. 2015. 111 pg. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A obesidade tem aumentado dramaticamente nos últimos anos, tornando-se o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, vários tipos de câncer, e também do Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2). A associação da obesidade com o desenvolvimento do DM 2 pode ser explicada, em parte, pela secreção alterada pelo tecido adiposo de adipocinas, como a adiponectina, um hormônio com propriedades antiinflamatórias e de sensibilização à insulina. O excesso do tecido adiposo regula negativamente a secreção de adiponectina, o que ocorre de 10 a 20 anos antes da hiperglicemia crônica, fazendo com que este hormônio seja um bom indicador para o diagnóstico preditivo de DM 2. A concentração de adiponectina em plasma é usualmente aferida por ELISA, método não amplamente utilizado devido ao seu alto preço, necessidade de pessoal qualificado e material e, dessa maneira, ainda praticamente inacessível à grande parcela da população. Sendo assim, o desenvolvimento de novas metodologias e de ferramentas de diagnóstico confiáveis e de baixo custo (que possam ser implementados pelo Sistema Único de Saúde – SUS) é imprescindível. Aqui, desenvolvemos um biossensor simples e de baixo custo para detecção de adiponectina baseado na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) ou voltametria cíclica (CV) usando plataformas nanoestruturadas contendo receptores transmembrana de adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) ou anticorpos anti-AdipoQ imobilizados em eletrodos de ouro. Os melhores resultados foram obtidos através do uso dos receptores AdipoR1/R2 em conjunto com CV. Neste caso, os biossensores foram capazes de detectar concentrações de adiponectina tão baixas quanto 7 nmol L^{-1} com uma faixa linear entre 0,01 a $0,75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de adiponectina, $R^2=0,992$. O dispositivo apresentou ótima seletividade, estabilidade e reprodutibilidade (ca. 1,7% para $n=3$). Além disso, em amostras de plasma humano, o biossensor obteve resultados muito próximos aos obtidos pelo método padrão ELISA, com desvio de 14%. Esperamos que este estudo propicie maior acessibilidade ao diagnóstico preditivo do DM 2 através de dispositivos mais baratos, rápidos e portáteis e que um maior número indivíduos possam ser alertados e orientados, evitando o desenvolvimento posterior da doença.

Palavras-chave: Adiponectina. Diabetes. Biossensor.

ABSTRACT

BRAZACA, L.C. **Development of a system for type 2 diabetes *mellitus* early diagnosis**. 2015. 111 pg. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Obesity has increased dramatically in the last few years, becoming the biggest risk factor for development of cardiovascular diseases, several types of cancer and also the type 2 diabetes *mellitus* (DM 2). The association between obesity and DM 2 can be partially explained by the altered secretion of adiponectin hormone by the adipose tissue, which presents anti-inflammatory and insulin sensitizing properties. The excess of adipose tissue regulates negatively adiponectin secretion, which occurs 10 to 20 years before chronic hyperglycemia, making this hormone a great biomarker for predictive DM 2 diagnosis. Adiponectin plasma concentration is usually measured by ELISA, a method not widely used due to its high cost, personal and material demand, being, therefore, not accessible to part of the population. Therefore, the development of new diagnostic methodologies and tools trustable and low-cost (that can be implemented by Sistema Único de Saúde – SUS) is crucial. Here we developed a simple and low-cost biosensor for adiponectin detection based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) or cyclic voltammetry (CV) using nanostructured platforms containing adiponectin transmembrane receptors (AdipoR1 and AdipoR2) or anti-AdipoQ antibodies immobilized on gold electrodes. The best results were achieved using AdipoR1/R2 receptors among with CV. In this case, biosensors were able to detect adiponectin at concentrations down to 7 nmol L⁻¹ in a linear detection range from 0.01 to 0.75 μmol L⁻¹ of adiponectin, R²=0.992. The device displayed great selectivity, stability and reproducibility (ca. 1.7% for n=3). For human plasma samples, analyses using the biosensor and the ELISA technique presented similar results, with deviations of 14%. Therefore, we expect that this study leads to a greater accessibility to predictive DM 2 diagnoses through cheaper, faster and portable devices, so that a higher number of patients may be alerted and oriented, avoiding further disease development.

Keywords: Adiponectin. Diabetes. Biosensor.

Lista de Figuras

Figura 1 –	Esquema contendo as principais partes de um biosensor.....	25
Figura 2 –	a) Estrutura de um anticorpo e b) interação entre anticorpo e antígeno.....	27
Figura 3 –	Estrutura da curcumina na forma ceto.....	33
Figura 4 –	a) Circuito de Randles e b) seu respectivo diagrama de Nyquist.....	37
Figura 5 –	Esquema da técnica de voltametria cíclica. a) potencial em função do tempo e b) gráfico de corrente contra potencial aplicado para o marcador ferricianeto de potássio.....	38
Figura 6 –	Disfunção do tecido adiposo na obesidade. FFA: ácidos graxos livres; IL-6, interleucina-6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio; TNF- α , fator de necrose tumoral α	42
Figura 7 –	Fonte e efeitos da adiponectina sobre as citocinas pró e antiinflamatórias. a) Adiponectina é produzida principalmente pelos adipócitos; b) A adiponectina interage com os receptores celulares AdipoR1 e AdipoR2, estimulando a ativação de PPAR α (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α), AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) e proteínas quinases p38 ativadas por mitógeno. A inibição da ativação transcricional de genes pró inflamatórios pelos PPARs ativados leva à efeitos antiinflamatórios. Funções antiinflamatórias estão também relacionadas à supressão da síntese de TNF e interferon- γ (IFN γ). ACC, acetil-CoA carboxilase; GLUT4, transportador de glicose tipo 4; IKK, quinase do inibidor do fator nuclear $\kappa\beta$; NF- $\kappa\beta$, fator nuclear $\kappa\beta$; PPRE, elementos de resposta a proliferador de peroxissomo; SREBP1C, proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol; TNFR, receptor de TNF.....	44
Figura 8 –	Montagem do dispositivo biossensor.....	50
Figura 9 –	Possível mecanismo da imobilização de curcumina à plataformas de ouro e de sua interação com agentes biosseletivos.....	56
Figura 10 –	Diagrama de Nyquist da construção do biossensor utilizando Cistamina/Curcumina e os receptores AdipoR1 e AdipoR2.....	58
Figura 11 –	Mecanismo de reação dos agentes de reticulação EDC e NHS. Neste caso, o esquema de reação está exemplificado para um substrato de ouro funcionalizado com ácido 3-mercaptopropiônico.....	59
Figura 12 –	Deteção de adiponectina pela técnica de EIS. Diagramas de Nyquist para as medidas realizadas em cada etapa de montagem do eletrodo a) 3-MPA/EDC/NHS/Receptores e b) 3-MPA/EDC/NHS/Ab.....	61
Figura 13 –	Estudo da relação entre a concentração de 3-MPA e a resistência do filme na detecção de 10^{-8} mol L ⁻¹ de adiponectina. a) eletrodo funcionalizado com Anti-AdipoQ; b) eletrodo funcionalizado com AdipoR1 e AdipoR2.....	64
Figura 14 –	Estudo do tempo mínimo necessário para a funcionalização do eletrodo de ouro com 3-MPA. O gráfico relaciona a mudança de resistência no filme ao tempo de reação.....	64
Figura 15 –	Relação entre a resistência do filme contendo EDC/NHS e o tempo de reação.....	65
Figura 16 –	Estudo da concentração ideal de agentes biosseletivos. Os gráficos relacionam a resistência do filme na detecção de adiponectina a 10^{-8} mol L ⁻¹ com a respectiva concentração de a) anti AdipoQ e b) AdipoR1/R2 utilizada na montagem.....	66

Figura 17 – Estudo do tempo mínimo necessário para a imobilização dos agentes de bioreconhecimento ao eletrodo. a) Anti-AdipoQ; b) AdipoR1/AdipoR2.....	67
Figura 18 – Estudo do tempo necessário para interação dos a) anticorpos e b) dos receptores com o hormônio adiponectina (10^{-8} mol L ⁻¹).....	68
Figura 19 – Reprodutibilidade na montagem e na detecção de adiponectina pela técnica EIS. Para a realização deste estudo, três construções foram realizadas em paralelo.....	70
Figura 20 – Voltamogramas cíclicos relativos ao estudo de reprodutibilidade utilizando a técnica CV. Diferentes etapas de montagem e a detecção de adiponectina (10^{-7} mol L ⁻¹) foram estudadas através da construção paralela de 3 biossensores.....	71
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos do estudo de estabilidade das construções contendo a) receptores AdipoR1/R2 e b) anticorpos anti-adipoQ.....	73
Figura 22 – Estudo da corrente-resposta em medidas sucessivas de CV. a) receptores AdipoR1/R2; b) anticorpos anti-adipoQ.....	74
Figura 23 – Teste de velocidade de varredura. Eletrodo de ouro recoberto com 3-MPA/EDC NHS/Receptores/ 10^{-7} Adiponectina na presença de 4 mmol L ⁻¹ de ferricianeto de potássio.....	75
Figura 24 – Topografia do filme biorreceptor 3-MPA/EDC NHS/AdipoR1 e AdipoR2.....	76
Figura 25 – Microscopia de força atômica, fase. a)ouro limpo; b)3-MPA; c)3-MPA/EDC NHS; d)3-MPA/EDC NHS/Receptores; e)3-MPA/EDC NHS/Anticorpos.....	77
Figura 26 – Resposta do eletrodo de ouro funcionalizado com 3-MPA/EDC/NHS/Agentes biológicos frente à diferentes concentrações de adiponectina na forma de diagramas de Nyquist e suas respectivas curvas de calibração. a) Anticorpos anti-AdipoQ e b) Receptores AdipoR1 e AdipoR2.....	80
Figura 27 – Resposta do eletrodo de ouro funcionalizado com 3-MPA/EDC/NHS/Agentes biológicos frente à diferentes concentrações de adiponectina na forma de voltamogramas cíclicos e suas respectivas curvas de calibração. a) Anticorpos anti-AdipoQ e b) Receptores AdipoR1 e AdipoR2.....	82
Figura 28 – Diagramas de Nyquist e curvas de calibração obtidas pelo biossensor construídos em ouro com a) 3-MPA/EDC/NHS/Receptores e b) 3-MPA/EDC/NHS/Ab	83
Figura 29 – Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes concentrações de adiponectina e suas respectivas curvas de calibração. Os resultados do biossensor baseado em 3-MPA/EDC/NHS/Receptores são mostrados em a), enquanto os relativos aos anticorpos são mostrados em b).....	84
Figura 30 – Estudo da correlação entre a concentração de adiponectina sérica e a condição de saúde dos pacientes. Observa-se claramente que os indivíduos com DM 2 já desenvolvida e os com tendência a desenvolver (obesos) apresentam concentrações inferiores do hormônio analisado.....	87
Figura 31 – Curva de calibração do biossensor para o hormônio adiponectina em amostras de plasma humano. a) Voltamogramas cíclicos e b) gráfico de corrente contra concentração de adiponectina.....	89
Figura 32 – Método de adição de padrão. Amostra de plasma 14.....	90

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Divisão de grupos e detalhes de dados das condições de saúde dos doadores de plasma humano.....	53
Tabela 2 – Valor médio da resistência do filme e o desvio padrão associado obtido pela técnica EIS para cada etapa de montagem do biossensor e na detecção de adiponectina. Três eletrodos distintos foram utilizados na investigação da reprodutibilidade.....	69
Tabela 3 – Estudo da reprodutibilidade na construção de biossensores utilizando a técnica CV. Valores relativos à corrente média do pico de oxidação e seu desvio padrão associado são apresentados para cada etapa de montagem do eletrodo e para a detecção de adiponectina (10^{-7} mol L ⁻¹).....	72
Tabela 4 – Resumo dos valores RMS de rugosidade e fase para cada uma das etapas de montagem do filme.....	78
Tabela 5 – Resumo dos parâmetros relacionados à detecção do hormônio Adiponectina para os sensores desenvolvidos com base no filme 3-MPA/EDC/NHS/Agente de biorreconhecimento.....	81
Tabela 6 – Comparação entre os diferentes biossensores desenvolvidos no projeto quanto aos parâmetros envolvidos na detecção do hormônio adiponectina	85
Tabela 7 – Descrição detalhada dos resultados obtidos através do teste ELISA para os três grupos de pacientes estudados (controle, diabéticos e obesos).	88
Tabela 8 – Comparação dos resultados obtidos através do método ELISA e pelo Biossensor na quantificação de adiponectina e categorização de pacientes.	91

Lista de Siglas e Abreviaturas

3-MPA – Ácido 3-mercaptopropiônico

Ab – Anticorpo

AC – Corrente alternada

ACC - Acetil-CoA carboxilase

AdipoQ - Adiponectina

AFM – Microscopia de força atômica

Ag - Antígeno

AMPK - Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ASP - Proteína estimulante de acilação

BSA – Albumina do soro bovino

C_{dc} – Capacitância da dupla camada

CDR – Regiões determinantes de complementaridade

CV – Voltametria cíclica

D - Coeficiente de difusão

DM 2 –Diabetes mellitus tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDC - 1etil-3-[3- dimetilaminopropil] carbodiimida

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FFA – Ácidos graxos livres

FTO – Óxido de estanho dopado com flúor

gAd - Fragmento globular da adiponectina

GLUT4 - Transportador de glicose tipo 4

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMW - Alto peso molecular

IFN γ - interferon- γ

Ig – Imunoglobulina

IL-6 - Interleucina 6

IKK - quinase do inibidor do fator nuclear $\kappa\beta$

I_p – Corrente no pico

IRS - Receptor de insulina

ITO – Óxido de índio dopado com estanho

LB – Langmuir Blodgett

LbL – Layer-by-Layer

LMW - Baixo peso molecular

MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos-1

MMW – Médio peso molecular

NF- κ B, fator nuclear $\kappa\beta$

NHS - N-hidroxisuccinimida

PAA - Ácido poli(acrílico)

PAH - Poli(alilamina hidrociorada)

PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio

PBS – Tampão fosfato salino

PCR - Proteína C-Reativa

PI3-K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PPAR - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PPRE - Elementos de resposta a proliferador de peroxissomo

PSS - Poli(estireno sulfonato de sódio)

QCM – Microbalança de Cristal de Quartzo

OMS - Organização Mundial de Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

R_s – Resistência da Solução

R_{tc} – Resistência de transferência de carga

SAM – Monocamadas automontadas

SPR – Ressonância Plasmônica de Superfície

SREBP1C - Proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNFR – Receptor de Fator de Necrose Tumoral

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

W - Elemento de Warburg

Z' - Parte real da impedância

Z'' - Parte imaginária da impedância

Sumário

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Dispositivos Biossensores.....	25
2.1.1 Camada de Biorreconhecimento	26
2.1.2 Imobilização dos Biorreceptores.....	29
2.1.3 Técnicas de Transdução	33
2.2 Diabetes <i>mellitus</i> : Importância como problema de saúde pública.....	38
2.3 Tecido Adiposo	40
2.4 Adiponectina e sua relação com o DM 2.....	43
2.5 Detecção de Adiponectina	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Modificação do Eletrodo	49
4.2 Medidas Eletroquímicas.....	50
4.3 Amostras de Plasma	52
4.4 Kit ELISA.....	53
4.5 Microscopia de Força Atômica	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Imobilização dos Agentes de Biorreconhecimento.....	55
5.1.1 Imobilização Utilizando Curcumina.....	55
5.1.2 Imobilização Através dos Agentes Reticulantes EDC/NHS.....	58
5.2 Otimização do Biossensor	61
5.2.1 Otimização do Ácido 3-Mercaptopropiônico	63
5.2.2 Otimização dos Agentes Reticulantes EDC/NHS	65
5.2.3 Otimização dos Agentes Biosseletivos	65
5.2.4 Otimização da Detecção do Hormônio Adiponectina	67
5.3 Caracterização do Biossensor	68
5.3.1 Reprodutibilidade.....	68
5.3.2 Estabilidade	72
5.3.3 Repetibilidade	73
5.3.4 Velocidade de Varredura	74

5.3.5 Microscopia de Força Atômica	76
5.4 Detecção de Adiponectina.....	78
5.4.1 Adiponectina de Roedores	78
5.4.2 Adiponectina Humana	82
5.5 Amostras Reais de Plasma Humano	86
5.5.1 Teste ELISA.....	86
5.5.2 Detecção com Biossensor	88
5.5.3 Comparação entre a detecção por ELISA e biossensor	90
6 CONCLUSÕES	93
7 PERSPECTIVAS.....	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES.....	107
Apêndice A – Publicações geradas no período de mestrado	107
A1 Participação em Eventos	107
A2 Matérias Encaminhadas Para Publicação.....	109
ANEXO	111
Parecer do Comitê de Ética	111

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade tem aumentado dramaticamente nos últimos anos. O excesso de peso corporal é um problema de saúde que atinge grandes proporções epidemiológicas, afetando não somente os países desenvolvidos, mas toda a população mundial. A obesidade, definida como o excesso da massa tissular adiposa, é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, vários tipos de câncer, e também do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2).¹

O tecido adiposo é um tecido metabolicamente ativo capaz de secretar múltiplas proteínas, fisiologicamente. A obesidade está fortemente associada com as mudanças na fisiologia do tecido adiposo levando à resistência à insulina, inflamação crônica e secreção alterada de citocinas, as adipocinas ou adipocitocinas.² As adiponectinas (adipoQ), um dos tipos de adipocitocinas secretadas, desempenham papel fundamental na homeostase energética por afetar a sensibilidade ao hormônio insulina, metabolismo de glicose e de lipídios, sistema de coagulação e processo inflamatório. A secreção de adiponectina é regulada negativamente pelo excesso de gordura corporal, e a sua baixa concentração na corrente sanguínea vem sendo relacionada à quadros de resistência à insulina e, posteriormente, ao desenvolvimento de DM 2. Por outro lado, outras adipocitocinas como as leptinas, interleucina-6, fator de necrose tumoral (TNF) - α , proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), são reguladas positivamente na obesidade e contribuem para o desenvolvimento do DM 2 e várias doenças cardiovasculares, pois seus efeitos são tanto locais quanto sistêmicos.³ Entre as muitas diferenças entre o tecido adiposo subcutâneo e o visceral, se inclui a expressão de diferentes genes envolvidos na resistência à insulina e inflamação, bem como os diferentes padrões de secreção de adipocinas.

Atualmente, a detecção do hormônio adiponectina é realizada através da técnica imunoenzimática ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Apesar da alta sensibilidade e confiabilidade envolvidas nesses testes, o alto custo de material, necessidade de pessoal qualificado e demanda de tempo para a realização impede com que o SUS (Sistema Único de Saúde) o ofereça a uma grande parcela da

população. Dessa maneira, o desenvolvimento de uma técnica para a detecção e quantificação rápida, simples e de baixo custo de adiponectina é de grande interesse. Dispositivos biossensores apresentam grande potencial para a resolução deste impasse, já que além de apresentarem as características descritas anteriormente, são altamente específicos e versáteis.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico nanoestruturado para quantificação de adiponectina em plasma humano. Para isso, agentes biosseletivos do hormônio adiponectina – anticorpos anti-AdipoQ e receptores transmembrana AdipoR1 e AdipoR2 - foram imobilizados em plataformas de ouro através da técnica de monocamadas automontadas (SAMs – *Self-assembled monolayers*). Diferentes técnicas de imobilização foram estudadas, como o uso dos agentes reticulantes EDC e NHS (1etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida e N-hidroxisuccinimida), já muito bem estabelecidos, como também o uso de corantes naturais como a curcumina – sendo este de caráter inovador, desenvolvido neste trabalho. A interação entre os filmes biosseletivos e o hormônio foi, então, monitorada através das técnicas de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV). O biossensor foi testado em amostras de plasma humano de pacientes em diferentes condições de saúde e, além disso, foi realizada uma comparação entre a técnica padrão ELISA e o dispositivo desenvolvido.

Através do desenvolvimento destes biossensores, esperamos aumentar o acesso aos testes de quantificação de adiponectina, permitindo o diagnóstico de um maior número de pacientes com tendência a desenvolver o diabetes e a sua orientação quanto às precauções a serem tomadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dispositivos Biossensores

Chamamos de biossensor um dispositivo capaz de fornecer informações analíticas composto de duas partes fundamentais conectadas: 1) um elemento de reconhecimento biológico, capaz de interagir de modo seletivo com um ou mais analitos; e 2) um transdutor, capaz de converter a resposta bioquímica em sinal apropriado, segundo o princípio físico-químico de transdução⁴⁻⁵ Um esquema de um dispositivo biossensor é apresentado na Figura 1. Podemos classificar os diferentes tipos de biossensores segundo o elemento de reconhecimento biológico ou segundo o processo utilizado na transdução, sendo, os biossensores eletroquímicos, os mais comuns.⁶ Desde os trabalhos seminais de Clark⁴, na década de 60, grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de biossensores. Isso vem ocorrendo principalmente devido à necessidade de análises clínicas baseadas em métodos mais rápidos, simples e de baixo custo. Neste aspecto, podemos citar a utilização de novas técnicas de transdução, a síntese de novos biocatalizadores e a utilização de novos materiais como matrizes de imobilização de agentes biosseletivos. Estão descritas abaixo, em maior detalhamento, cada uma das partes de um biossensor.

Figura 1 - Esquema contendo as principais partes de um biossensor.

FONTE: Elaborada pelo autor.

2.1.1 Camada de Biorreconhecimento

A camada de biorreconhecimento tem como principal função a de interagir seletivamente, em amostras complexas, com o analito de interesse – causando mudanças em propriedades do filme a serem detectadas pelo mecanismo de transdução. Dessa maneira, características muito importantes a serem consideradas na escolha da molécula de biorreconhecimento são a alta especificidade e seletividade pelo analito. Sendo assim, compostos biológicos como anticorpos, enzimas, células ou proteínas receptoras são amplamente utilizados na construção de biossensores.

Anticorpos

Os anticorpos (Ab), ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas de defesa produzidas pelos linfócitos B em decorrência a resposta imunológica à corpos estranhos - também chamados antígenos (Ag). Estes são usados pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar objetos estranhos e são funcionalmente definidos pelo antígeno com o qual reagem. Todos os cinco tipos de imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) são constituídas de cadeias pesadas (H) e leves (L) e de domínios constantes (C) e variáveis (V) – sendo que os últimos determinam a especificidade do anticorpo. A maioria das diferenças entre estas proteínas está em pequenas extensões em formato de alças com aproximadamente dez aminoácidos de suas cadeias pesada (VH) e leve (VL), chamadas de segmentos hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). Estas, em conjunto, formam uma superfície complementar à estrutura tridimensional do antígeno, gerando múltiplos contatos com este dando assim, especificidade ao anticorpo.⁷⁻⁸

A formação do complexo antígeno-anticorpo, por sua vez, é inteiramente dependente de interações não covalentes, que estão sujeitas ao alinhamento preciso entre as moléculas. Estas incluem ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações coulômbicas e interações hidrofóbicas. Pequenas mudanças na estrutura do antígeno podem afetar profundamente a força da interação, o que justifica a sua grande especificidade. A perda de uma única ligação de hidrogênio na interface, por exemplo, pode reduzir a força da interação 1000 vezes.

Figura 2 - a) Estrutura de um anticorpo e b) interação entre anticorpo e antígeno.

FONTE: NELSON; COX⁹

O uso de anticorpos como elemento de reconhecimento se baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo. As principais vantagens dos imunossensores são:

- Alta especificidade os torna ferramentas poderosas para a captura por afinidade dos ligantes em amostras impuras;
- Os anticorpos podem ter sua orientação controlada para interação mais eficiente com o analito;
- A maioria dos anticorpos monoclonais são facilmente regenerados;
- Disponibilidade comercial de materiais;
- Pequeno volume de amostra necessário para a análise.
-

Proteínas Receptoras

São proteínas que se ligam a alvos específicos, induzindo uma resposta celular - como a abertura de canais na membrana celular ou reações em cadeia

envolvendo diversas outras moléculas. Os receptores comumente respondem à hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e citocinas, por exemplo. Seu uso em biossensores é de grande interesse devido à alta especificidade e afinidade destes compostos pelos respectivos ligantes, além de serem alvos naturais para uma grande variedade de drogas e toxinas. A extração, solubilização e isolamento de receptores transmembrana ainda é um desafio¹⁰ e, sendo assim, estes são menos disponíveis comercialmente e tem um preço mais elevado.

Enzimas

Enzimas são moléculas de natureza usualmente protéica (podendo também serem constituídas de RNA – ácido ribonucleico) com atividade catalítica. Estas agem através da diminuição da energia de ativação da reação e assim, catalisam reações que não ocorreriam ou ocorreriam lentamente em sua ausência. Além de alta especificidade e atividade catalítica, as enzimas são muito interessantes para aplicação em biossensores devido à variedade de produtos de reações mensuráveis que surgem do processo catalítico, que incluem prótons, elétrons, luz e calor.¹¹ Em biossensores eletroquímicos, as enzimas proporcionam uma diminuição nos potenciais de oxidação/redução dos analitos de interesse, além de aumentarem a sensibilidade do sensor através do aumento na corrente de trabalho. Óxido-redutases, hidrolases e liases são muito utilizadas.¹²

Ácidos nucleicos

Ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por nucleotídeos, podendo ser classificados em DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA de acordo com o açúcar e as bases nitrogenadas que os compõe. Ocorrem em todas as células vivas e são responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação genética, sendo que sua transdução leva à síntese de proteínas. Sendo assim, são fundamentais para a sobrevivência e o controle celular. Alterações nas sequências de nucleotídeos causadas por mutações ou heranças genéticas podem levar à doenças sérias como o câncer, a anemia falciforme e a fibrose cística. A análise dos ácidos nucleicos é fundamental para o diagnóstico e identificação do traço genético de

diversas doenças relevantes. Com o uso de biossensores, o diagnóstico pode ser realizado de forma simples através do monitoramento da hibridização entre o material vindo do paciente e uma sequência de nucleotídeos curta (15 a 30 pares de base) imobilizada em um substrato.

2.1.2 Imobilização dos Biorreceptores

Uma característica que afeta diretamente a sensibilidade e o limite de detecção dos dispositivos biossensores é o tipo de imobilização utilizada para os elementos de reconhecimento biológico. Para isso, são comumente utilizadas técnicas como a construção de filmes finos, oclusão em géis e microencapsulação. Entre essas, a construção de filmes finos é de grande interesse devido à sua versatilidade, simplicidade e habilidade de formar estruturas estáveis e reproduzíveis. Para isso, métodos como layer-by-layer (LbL), Langmuir-Blodgett (LB) e SAMs podem ser utilizados.¹³⁻²¹

Layer-by-Layer

A técnica LbL foi introduzida em 1992 por Decher, Hong e colaboradores²² visando a preparação simples, rápida e controlada de filmes finos para aplicações biológicas. Os princípios do LbL se baseiam principalmente em interações eletrostáticas: inicia-se com um substrato com determinada carga superficial – por exemplo, é conhecido que metais, vidros e derivados de silício possuem carga superficial negativa em solução devido à oxidação superficial e hidrólise. O substrato, então, é imerso por um período que pode variar de segundos a minutos em uma solução de polieletrólitos de carga contrária. Dessa maneira, a carga total da superfície se inverte devido à adsorção e compensação do polieletrólito com carga oposta. Uma lavagem subsequente remove moléculas fracamente ligadas. Em seguida, procedimento análogo é realizado em solução de carga semelhante à do substrato. Como resultado, uma dupla camada de polieletrólitos com espessura da ordem nanométrica se forma no suporte. O procedimento pode ser realizado ciclicamente, promovendo a construção de filmes multicamadas com espessura

controlada, de maneira muito simples e robusta. PAH (poli(alilamina hidrocloreada)), PSS (poli(estireno sulfonato de sódio)) e PAA (ácido poli(acrílico)) são exemplos de polieletrólitos comumente utilizados.²³⁻²⁴

A técnica pode ser aplicada na maior parte de espécies carregadas, incluindo nanomateriais,²⁵⁻²⁷ dendrímeros²⁸, ácidos nucleicos,²⁹ polipeptídeos³⁰ e vírus³¹. Além disso, a formação de filmes LbL não está limitada a interações eletrostáticas. Construções baseadas em ligação de hidrogênio³², transferência de cargas³³, ligação covalente³⁴, reconhecimento biológico³⁵ e interações hidrofóbicas³⁶ também foram descritas.³⁷

Langmuir-Blodgett

A técnica de crescimento de filmes LB foi desenvolvida por Langmuir e Blodgett na década de 20. Esta se baseia principalmente nas interações entre moléculas anfifílicas e uma superfície líquida. No processo, uma monocamada insolúvel de moléculas anfifílicas é espalhada em uma superfície aquosa. Em seguida, a monocamada é comprimida até atingir uma densidade específica e é transferida para um suporte sólido. Este procedimento pode ser repetido, criando filmes de múltiplas camadas. Como as camadas são organizadas e o tamanho das moléculas são usualmente conhecidos, o controle da espessura do filme fino é da ordem nanométrica. Além disso, o método LB se destaca pelo controle preciso da sequência e da estrutura das camadas adsorvidas. A necessidade de equipamentos especializados e a demora na construção do filme, porém, são fatores limitantes desta técnica.³⁸ O LB vem sendo utilizado com sucesso para criação de filmes de diversos componentes biológicos, incluindo proteínas³⁹ e enzimas⁴⁰

Monocamadas automontadas

Monocamadas automontadas são estruturas molecularmente ordenadas e orientadas formadas pela adsorção espontânea de moléculas em uma superfície sólida. Para a construção destas, o substrato é imerso na solução contendo as moléculas a serem adsorvidas por um período que pode variar de segundos a horas.

Uma monocamada densa e altamente organizada então se forma espontaneamente através da interação entre grupamentos químicos do composto ativo e do substrato, deixando extremidades opostas da molécula livres para interações subsequentes.⁴¹ A rápida adsorção ocorre devido à diminuição da energia livre de superfície do substrato⁴² e as camadas são altamente estáveis devido à forte adsorção química dos *head groups*, criando estruturas mais estáveis do que a técnica LB.⁴³⁻⁴² Além disso, a SAM apresenta controle de espessura nanométrico e uma ótima flexibilidade, sendo capaz de imobilizar uma grande variedade de materiais orgânicos como DNA, anticorpos, proteínas ou mesmo células inteiras em diversos substratos.⁴⁴ A simplicidade e versatilidade do processo faz com que esta técnica seja altamente atrativa para a indústria.

Materiais

Alguns materiais utilizados na imobilização da camada de biorreconhecimento são descritos com maior detalhamento. Além disso, um método de imobilização inovador desenvolvido por nós também é apresentado:

Cistamina

A cistamina (2,2 – diaminoetildissulfeto) é um amino-sulfeto de cadeia curta. Os átomos de enxofre presentes em sua molécula são capazes de interagir com plataformas de ouro, deixando a extremidade amino oposta disponível para formação de ligações covalentes com diferentes compostos. Um dos compostos mais utilizados é o glutaraldeído (1,5 pentanedial), um dialdeído saturado. Uma das extremidades do glutaraldeído fica disponível, então, para a interação com grupamentos amina dos bioreceptores a serem imobilizados. Uma das vantagens desta técnica é a grande estabilidade dos materiais, além do tempo necessário para a imobilização ser curto.⁴⁵

EDC/NHS

Uma das estratégias mais comuns para imobilizar os agentes biosseletivos é o uso dos agentes EDC/NHS, os quais possuem uma química de ligação bem estabelecida que pode ser realizada tanto em soluções quanto em superfícies⁴⁶. O EDC, muito utilizado para ligar proteínas à substratos⁴⁷, é um agente de ligação de comprimento zero tipicamente usado para acoplar grupos carboxílicos à aminas primárias. Apesar deste processo poder ser realizado somente com o uso do EDC, este geralmente é usado em conjunto com o NHS ou Sulfo-NHS. Isso porque a adição destes às reações de EDC aumentam a eficiência da ligação, além de permitir com que os grupos sejam ativados e armazenados a seco para uso posterior.⁴⁸⁻⁴⁹ Tanto o EDC quanto o NHS não continuam fazendo parte da ligação entre o substrato e o componente a ser imobilizado - são liberados em solução em formas e concentrações que possuem citotoxicidade muito baixa⁵⁰⁻⁵² - em contraste a agentes convencionais, como glutaraldeído ou poliepóxi. Outras vantagens desta abordagem incluem a ligação à temperatura ambiente.⁵³ Este vem sendo amplamente utilizado para a imobilização de DNA, enzimas e anticorpos⁵⁴⁻⁵⁶ em biossensores, por exemplo.

Curcumina

Uma técnica de imobilização dos agentes biosseletivos, de caráter inovador, foi desenvolvida por nós. Esta faz uso de um corante e tempero natural chamado curcumina (diferuloilmetano). A curcumina é um polifenol hidrofóbico derivado do açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), e vem atraindo muita atenção da comunidade científica pelo seu amplo espectro de atividades farmacológicas e biológicas. Esta atua no organismo através da sua capacidade de ligação à uma grande diversidade de proteínas e de inibição de diversas quinases. Através da modulação de fatores de transcrição, por exemplo, a curcumina é capaz de regular a expressão de enzimas inflamatórias, citocinas, moléculas de adesão e de proteínas relacionadas à sobrevivência celular.⁵⁷ Estudos apontam que a curcumina exibe atividade antioxidante,⁵⁸ antiinflamatória⁵⁹, antimicrobial⁶⁰⁻⁶¹ e anticarcinogênica⁶²⁻⁶³. A última se baseia principalmente no fato de que a curcumina atua como agente

antiproliferativo, anti invasivo e antiangiogênico; esta inibe a expressão dos genes promotores de crescimento e de metástase, além de regular a atividade de diversas enzimas que mediam o crescimento do tumor.⁵⁷ Adicionalmente, os efeitos de proteção do fígado e do rim ⁶⁴⁻⁶⁵, supressão da trombose ⁶⁶, proteção contra infarto de miocárdio ⁶⁷, hipoglicêmico ⁶⁸ e antireumático⁶⁹ da curcumina são também muito bem estabelecidos no meio acadêmico.

Diversos modelos animais e estudos clínicos mostram que a curcumina é extremamente segura mesmo em altas doses (12 g por dia no período de 3 meses) ^{70 71}. Sua segurança farmacológica e eficácia a tornam um composto com grande potencial para tratamento e prevenção de uma grande variedade de doenças humanas, como diabetes, doença de Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovasculares, pulmonares, artrite e diversos tipos de câncer.⁵⁷ Apesar de sua eficácia e segurança, a curcumina ainda não foi aprovada como agente terapêutico, principalmente devido à sua baixa biodisponibilidade.⁶²

Figura 3 - Estrutura da curcumina na forma ceto.

FONTE: Elaborada pelo autor.

O interesse em utilizar a curcumina na imobilização de compostos biológicos em biossensores se baseia principalmente na presença de múltiplas dupla ligações em sua molécula – dando-a rigidez e habilidade de transportar elétrons com grande facilidade. Além disso, os grupamentos presentes nas extremidades da molécula permitem a imobilização desta em conjunto à diferentes compostos, como a cistamina.

2.1.3 Técnicas de Transdução

O processo de transdução é responsável por transformar a interação que ocorre entre o analito e os bioreceptores em um sinal mensurável. Sendo assim, influencia principalmente na sensibilidade e limite de detecção do sensor. As

principais técnicas de transdução são ópticas, piezoelétricas, calorimétricas e eletroquímicas. As duas mais comuns são descritas e discutidas abaixo.

Ópticas

Se baseiam em mudanças em propriedades ópticas, como a absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade e comprimento de onda. Entre as técnicas ópticas, o *Surface Plasmon Resonance* (SPR) se destaca na investigação de interações biomoleculares devido à alta sensibilidade. Vantagens de biossensores ópticos incluem boa biocompatibilidade, alta velocidade de resposta, tamanho reduzido e imunidade à ruídos eletromagnéticos.

Eletroquímica

A eletroquímica pode ser definida como o estudo de fenômenos em interfaces sob a aplicação de campos elétricos. Geralmente, a interface ocorre entre um condutor metálico (eletrodo) e um condutor iônico fluido (eletrólito), sendo que o campo elétrico é controlado externamente por um potenciostato/galvanostato. Biossensores eletroquímicos são capazes de monitorar o analito através do acompanhamento de reações de óxido-redução, mudanças na impedância e/ou condutividade do filme imobilizado, por exemplo. Estes permitem a análise de espécies com grande especificidade, rapidez, sensibilidade, alta seletividade e baixo custo.⁷² Podem ser utilizados em análises químicas, em controles industriais ou meio ambiente ou mesmo em estudos *in vivo*⁷³. Além disso, desempenham um importante papel na área de diagnósticos principalmente devido ao seu baixo custo e rapidez.

Para que as reações eletroquímicas sejam detectáveis, estas geralmente devem acontecer muito próximas às superfícies dos eletrodos – sendo assim, sua composição, tamanho, forma e funcionalização possuem papel fundamental no desempenho de biossensores. Usualmente, experimentos eletroquímicos são realizados em uma célula contendo o eletrólito e três eletrodos distintos: de trabalho, referência e contra-eletoodo.

O eletrodo de trabalho é o elemento fundamental na coordenação da transdução da reação eletroquímica. Este usualmente é funcionalizado visando o

aumento da sensibilidade e seletividade do biossensor, devendo ser composto de materiais condutivos e estáveis. Sendo assim, ouro, ITO (Óxido de índio dopado com estanho), FTO (Óxido de estanho dopado com flúor) e carbono são comumente usados. O contra-eletrodo, por sua vez, estabelece a conexão, com a solução eletrocatalítica, para a aplicação de potenciais entre este e o eletrodo de trabalho. Este deve apresentar uma área maior do que a do eletrodo de trabalho, garantindo assim que a reação ocorrendo em seu extremo não limite a reação ocorrendo no oposto. A platina é amplamente utilizada para a fabricação de contra-eletrodos por ser um metal inerte como também porque reações eletrônicas ocorrem muito rapidamente em sua superfície. Outras escolhas de menor custo podem incluir carbono, cobre ou aço inoxidável.⁷⁴ O eletrodo de referência, por sua vez, comumente composto de Ag/AgCl ou calomelano saturado, tem a função de manter um potencial referência conhecido e constante e, por isso, é mantido à certa distância da reação.⁷⁵

Biossensores eletroquímicos podem ser divididos em classes, dependendo do tipo de parâmetro utilizado para detecção. As mais comuns são descritas abaixo:

Amperométrico/Voltamétrico: Baseiam-se em medidas de corrente resultantes das reações de oxido-redução das espécies eletroativas. A direção da reação pode ser facilmente controlada através da aplicação de um potencial elétrico no eletrodo de trabalho. Geralmente possuem tempos de resposta, faixas dinâmicas e sensibilidades semelhantes aos biossensores potenciométricos.⁷⁶⁻⁷⁷

Potenciométrico: Baseiam-se na diferença de potenciais entre dois eletrodos. Neste tipo de sistema, altas impedâncias impedem o fluxo de corrente significativa entre os eletrodos, evitando distorções nas reações.⁷⁶ Um exemplo muito comum de um sensor potenciométrico é o pHmetro.

Condutimétrico: Baseiam-se em mudanças de condutância, que podem ocorrer devido à aderência de novos materiais ao sensor ou através do uso de enzimas, por exemplo. Ao catalisar reações, enzimas produzem ou consomem íons, alterando a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito – fazendo, assim, que haja uma mudança na condutância.⁷⁷

Impedimétricos: São baseados na análise combinada das propriedades resistivas e capacitivas dos materiais. Técnicas impedimétricas – como a espectroscopia de impedância eletroquímica – são também comumente utilizadas para a caracterização de filmes finos sobre eletrodos.⁷⁸

Dependendo do tipo de sistema biossensor em questão, diferentes técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas. Estas, em geral, podem ser divididas em voltamétricas – quando o potencial aplicado é variável, por exemplo: CV, onda quadrada, pulso diferencial – ou cronoamperométricas – quando o potencial sobre o eletrodo de trabalho é constante em um período determinado, por exemplo: cronoamperometria. Além disso, existem técnicas que não se encaixam nessas definições, como a EIS, que é baseada na excitação da amostra em diferentes frequências.

Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Entre as diferentes técnicas de transdução utilizadas em biossensores, a espectroscopia de impedância eletroquímica é muito eficiente para traduzir a interação do analito em superfícies funcionalizadas.⁴⁴ Imunossensores⁷⁹, genossensores⁸⁰ e biossensores enzimáticos⁸¹ baseados em na detecção por EIS são comumente encontrados na literatura. A EIS se baseia na excitação da amostra pela aplicação de sinais AC (Corrente Alternada) de baixa amplitude em uma grande diversidade de frequências (neste caso entre 10 MHz e 100 mHz). A partir da resposta do sistema, pode-se obter, então, dados sobre a resistência e capacitância da amostra analisadas.

Os resultados são comumente visualizados através do diagrama de Nyquist, que corresponde a um gráfico com o eixo x representando a parte real da impedância (Z') e o eixo y representando a parte imaginária ($-Z''$), sendo, cada um dos pontos, medido em uma frequência distinta. Uma grande desvantagem desta representação é a ausência do valor de frequência relacionado a cada ponto. Outro tipo comum de representação dos resultados é o diagrama de Bode. Neste caso, o

eixo x representa o logaritmo da frequência da medida, enquanto o eixo y mostra o deslocamento de fase ou a impedância total do sistema. Softwares especializados, como Zplot/Zview (Scribner Associates Inc.) e Gamry EIS 300 (Gamry Instruments), são capazes de criar circuitos equivalentes baseados nos espectros EIS, fornecendo detalhes sobre as características elétricas do filme.

Um circuito que modela tipicamente as características de um biossensor é o circuito de Randles. Um modelo deste se encontra na Figura 4a, juntamente com seu respectivo diagrama de Nyquist na Figura 4b:

Figura 4 – a) Circuito de Randles e b) seu respectivo diagrama de Nyquist.

FONTE: Elaborada pelo autor.

onde R_s , C_{dc} , R_{tc} e W representam, respectivamente, a resistência da solução, a capacitância da dupla camada, a resistência de transferência de carga e o elemento de Warburg - relacionado a difusão de cargas na solução. A adição de materiais no filme muda a resposta na impedância eletroquímica principalmente devido à mudanças na capacitância da dupla camada e na resistência de transferência de cargas. Conforme ocorre a adição de material neutro, por exemplo, R_{tc} tende a se tornar maior, aumentando assim também o raio do semi-círculo. A presença da reta a aproximadamente 45° após o semi-círculo é referente à difusão das espécies no sistema.

Voltametria Cíclica

Outra técnica comumente aplicada à biossensores é a voltametria cíclica¹³. Esta consiste, basicamente, na aplicação de ciclos de uma janela de potencial no eletrodo de trabalho enquanto a corrente-resposta é monitorada. A partir deste método, pode-se obter informações sobre a oxidação e redução de espécies através da observação de picos formados no voltamograma. A funcionalização do eletrodo de trabalho usualmente possui a função de tornar as reações de oxidação-redução mais seletivas, sensíveis e/ou diminuir o sobrepotencial de trabalho. Uma abordagem diferente consiste no acompanhamento dos picos das reações de um composto já bem estabelecido (por exemplo ferricianeto de potássio) para a obtenção de informações sobre espécies adsorvidas no eletrodo de trabalho – de acordo com suas características, estas podem deslocar os picos para potenciais diferentes ou modificar a corrente-resposta através de mudanças na resistência ou capacitância do filme fino.

Figura 5 - Esquema da técnica de voltametria cíclica. a) potencial em função do tempo e b) gráfico de corrente contra potencial aplicado para o marcador ferricianeto de potássio.

FONTE: Elaborada pelo autor.

2.2 Diabetes *mellitus*: Importância como problema de saúde pública

Considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia mundial, o diabetes *mellitus* atinge hoje mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Estimativas indicam que em 2030 esta patologia acometerá quase 400 milhões de pessoas.⁸² Sendo uma doença de proporções crescentes, o diabetes

mellitus afeta pessoas de todas as idades e em todos os níveis sócio-econômicos, sendo hoje um sério problema de saúde pública em todo o mundo ocidental.⁸²⁻⁸⁶

Caracterizado por uma desordem metabólica de etiologia múltipla que apresenta uma hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, o diabetes *mellitus* ainda não tem suas causas bem elucidadas. Tais distúrbios são resultantes de deficiências na secreção ou ação da insulina, ou de ambas, nos tecidos alvos. Sabe-se ainda que a resistência à insulina tem um papel importante no desenvolvimento do DM 2.⁸⁷⁻⁸⁸

A insulina é um importante hormônio polipeptídico anabólico formado por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias α e β ligadas por pontes de dissulfeto. Sua ação é essencial para o crescimento, função das células β pancreáticas, homeostase de glicose e metabolismo de gorduras e proteínas. A insulina é sintetizada, armazenada e secretada pelas células β pancreáticas, localizadas dentro das ilhotas de *Langerhans* na parte endócrina do pâncreas. Para exercer suas ações celulares, a insulina se liga ao seu receptor transmembrana, uma molécula heterotetramérica com capacidade de autofosforilação. Esta estimula a porção tirosina quinase intrínseca do receptor, o qual fosforila seus próprios resíduos tirosina e também resíduos tirosina seletivos de proteínas alvo, entre elas uma família de substratos do receptor de insulina (IRS) denominadas IRS -1, -2, -3 e -4.⁸⁹

Os substratos do receptor de insulina fosforilados em tirosinas funcionam como proteína “ancoradouro” para outras moléculas sinalizadoras, e podem se associar com a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K).⁸⁹ Esta associação ativa uma cascata de outros eventos, sendo crucial à ativação de uma serina/treonina quinase B, conhecida como PKB ou Akt. Esta proteína alvo intermedia funções de crescimento e metabolismo da insulina, como o deslocamento do transportador de glicose GLUT4 de seu “pool” intracelular para a membrana plasmática, a inibição da produção de glicose hepática, a estimulação da síntese de glicogênio e proteína, a regulação da função da célula β , e ainda a iniciação da transcrição de genes específicos para diferenciação e crescimento celular.

Sendo responsável por cerca de 80 a 90% dos casos, o DM 2 ou “não insulino-dependente” é causado pela redução da sensibilidade dos tecidos alvo à ação metabólica da insulina, sendo conhecido como resistência à insulina.⁹⁰ A resistência à insulina é definida como ação insuficiente da insulina para manter a homeostase de glicose, caracterizada pela diminuição da capacidade celular em

e elevar o transporte e/ou utilização de glicose em resposta à ação da insulina. Nessa condição, a menor captação de glicose faz com que seus níveis séricos tendam a se elevar, promovendo um quadro de intolerância à glicose. Há maior estímulo para a liberação de insulina e, conseqüentemente, instala-se um quadro de hiperinsulinemia.⁹¹ Altos índices de glicose no sangue são responsáveis por uma série de sintomas como perda de peso, poliúria, sede excessiva, polifagia, glicosúria, dificuldade de cicatrização, entre outros.⁹² Quando não há acompanhamento adequado, o quadro evolui para complicações severas como perda da visão, derrame cerebral, ulcerações, podendo levar a amputação de membros inferiores, infarto agudo do miocárdio e, em casos extremos, a morte.⁹³

O início da doença ocorre a partir dos 40 anos de idade, sendo mais freqüente entre 50 e 60 anos, e desenvolve-se de forma lenta.⁹⁰ Evidências demonstram que a resistência à insulina pode ser detectada de 10 a 20 anos antes do início da hiperglicemia crônica, e estudos prospectivos apontam a resistência à insulina como um bom indicador do desenvolvimento futuro de DM 2.

Mais de 80% das pessoas com DM 2 apresentam sobrepeso ou obesidade, indicando forte correlação entre estar acima do peso e desenvolver diabetes.⁹⁴⁻⁹⁶ Além disso, o sobrepeso e a obesidade apresentam-se como os principais fatores de riscos para outras doenças crônicas, incluindo dislipidemias, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. A conseqüência para a saúde implica em maior morbidade e precoce mortalidade.⁹⁵⁻⁹⁷ Essa doença também está intimamente relacionada com intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, e as demais características da chamada Síndrome Plurimetabólica (hipertensão, níveis reduzidos de colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*, também chamado de "colesterol bom") e níveis elevados de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein* ou "colesterol ruim").

2.3 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um órgão que pode ser encontrado de duas formas: 1) o tecido adiposo marrom/pardo ou multilocular, que se encontra em maiores quantidades nos recém-nascidos e, no decorrer do desenvolvimento, diminui em massa até quase desaparecer na vida adulta. Sua principal função, vital para os

recém-nascidos, é a homeostase da temperatura corpórea, funcionando como um isolante térmico; 2) o tecido adiposo branco ou unilocular, que é também o mais predominante no corpo, se encontra na região subcutânea e em torno das vísceras. Este é composto de adipócitos e de seus precursores, delineados por tecido conjuntivo frouxo. É também o tecido mais vascularizado e innervado do organismo, apresentando grandes quantidades de macrófagos e fibroblastos, além de células indiferenciadas.⁹⁸

Desde o início de seu estudo, o tecido adiposo sempre foi citado como um excelente depósito de energia em forma de gordura. O paradigma de que este tecido é somente o maior órgão de reserva energética corporal - o que lhe confere papel essencial na sobrevivência, podendo manter um indivíduo com gasto energético diário de 2000 kcal por até dois meses sem se alimentar - passou por mudanças.⁹⁸⁻⁹⁹

Atualmente, já se sabe que o tecido adiposo sintetiza e, ao mesmo tempo, é alvo de variados compostos protéicos e não protéicos, que modulam seu próprio metabolismo e o de outros tecidos. Essas substâncias, também chamadas de adipocinas, apresentam efeitos a nível sistêmico, endócrino, autócrino e parácrino⁹⁹, participando não só do armazenamento de energia, como também da sua própria homeostase.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Assim, a relevância do tecido adiposo vem crescendo: se antes ele era considerado essencial para a sobrevivência, agora, ele é essencial para a qualidade de vida. Isto se atribui pela sua importância no: (i) Balanço corporal; (ii) Metabolismo do próprio tecido adiposo; (iii) Homeostase da pressão arterial; (iv) Sensibilidade à Insulina; (v) Regulação no eixo gonadotrófico, cortico-adrenal. Estas características conferem ao tecido adiposo grande relevância fisiológica e fisiopatológica.

Dentre as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se: Interleucina 6 (IL-6), citocina pró-inflamatória; Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), citocina pró-apoptose, além de inibidora da lipogênese; inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), promotor de trombose e ruptura de placas aterogênicas instáveis. São secretadas ainda Proteína C-Reativa (PCR), marcador inflamatório; Resistina, proteína com propriedades pró-inflamatórias; Proteína Estimulante de Acilação (ASP), inibidora da lipólise; receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR- γ), ativador da adipogênese e promotor do aumento da sensibilidade à insulina; Leptina, importante lipostato e reguladora do sistema

imunológico e respiratório; e adiponectina. Esta última é secretada exclusivamente pelo tecido adiposo, e tem importante papel na sensibilidade à insulina.¹⁰⁰

A obesidade vem sendo relacionada ao quadro de resistência à insulina há muito tempo.¹⁰¹ Além disto, vem sendo observado que, na maioria dos pacientes obesos, a doença está associada com processo inflamatório de baixo grau relacionado ao tecido adiposo branco, como resultado da ativação crônica do sistema imune inato. Este cenário pode subsequenteamente levar ao quadro de resistência insulínica, tolerância prejudicada à glicose, e mesmo diabetes.¹⁰²

O tecido adiposo branco encontra-se infiltrado por macrófagos durante a obesidade, o qual pode ser a maior fonte de citocinas pró-inflamatórias. A perda de peso está associada com a redução do infiltrado de macrófagos do tecido adiposo branco, melhorando o perfil inflamatório. Desta forma, vários fatores, não somente os adipócitos, como também o infiltrado de macrófagos, contribuem para a patogênese da resistência à insulina, de acordo com a Figura 6:

Figura 6 - Disfunção do tecido adiposo na obesidade. FFA: ácidos graxos livres; IL-6, interleucina-6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio; TNF- α , fator de necrose tumoral α .

FONTE: KRUIJSDIJK; VAN DER WALL; VISSEREN²

2.4 Adiponectina e sua relação com o DM 2

A adiponectina, cuja atividade anti-diabética e antiaterogênica tem sido constatada¹⁰³, é um hormônio protéico. A seqüência sinal amino-terminal desta molécula liga-se a uma fita de 27 aminoácidos (cauda colágeno-símile) e conecta-se a um domínio globular carboxi-terminal. Sua constituição é de 247 aminoácidos, totalizando um peso molecular de 28 kD.¹⁰⁴

A produção de adipoQ ocorre majoritariamente em células do tecido adiposo, tanto no multilocular como no unilocular. A síntese e a maturação intra-celular duram aproximadamente três horas, principalmente devido a hidróxi-prolinações, glicosilações e à capacidade de homo-oligomerização por pontes dissulfeto entre os domínios colágeno-símiles. Cada unidade básica é composta de três monômeros de adiponectina unidos pela base do domínio globular. Na circulação sanguínea, são encontradas: formas de alto peso molecular (HMW), que são junções de quatro até seis unidades triméricas; formas de peso molecular médio (MMW), que são hexâmeros e de baixo peso molecular (LMW), que são as unidades triméricas.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Quanto maior a quantidade de gordura, menor é a síntese do monômero quanto à oligomerização em complexos de alto peso molecular.

A adipoQ circula em abundância. A alta concentração, de 5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, faz com que represente 0,01% das proteínas plasmáticas. Seu reconhecimento é feito pelos receptores transmembrânicos AdipoR1 e AdipoR2. O primeiro, abundante em músculos esqueléticos, tem alta afinidade pelo fragmento globular da adiponectina (gAd). Já o segundo, presente no fígado, ainda interage com as formas completas do hormônio (trímeros, hexâmeros, dodecâmeros octodecâmeros). T-cadeína também é capaz de reconhecer as formas poliméricas, à exceção da adiponectina LMW, e é expressa em muitos tipos celulares, como no endotélio e musculatura lisa.

Além de desempenhar importante papel na regulação do catabolismo de ácidos graxos, outros mecanismos biológicos já se mostraram associados ao hormônio. Obesidade, excesso de gordura visceral, artrite reumatóide, arteriosclerose, câncer, doenças hepáticas e DM 2 estão atrelados a níveis baixos de adiponectina sérica.¹⁰⁷ Em contrapartida, o aumento de seu nível sérico já mostrou ser capaz de reduzir níveis de glicose pela inibição de enzimas hepato-gliconeogênicas, melhorar a sensibilidade à insulina nos casos de Diabetes tipo I e tipo II, além de promover perda de peso.¹⁰⁸ Assim, em indivíduos saudáveis, a

concentração total do hormônio é mais elevada, e se destaca o fato da razão de suas concentrações na forma HMW e LMW também o ser. A Figura 7 demonstra a estrutura do AdipoR1/R2, bem como suas vias de sinalização intracelulares relacionadas ao receptor de insulina:

Figura 7 – Fonte e efeitos da adiponectina sobre as citocinas pró e antiinflamatórias. a) Adiponectina é produzida principalmente pelos adipócitos; b) A adiponectina interage com os receptores celulares AdipoR1 e AdipoR2, estimulando a ativação de PPAR α (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α), AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) e proteínas quinases p38 ativadas por mitógeno. A inibição da ativação transcricional de genes pró inflamatórios pelos PPARs ativados leva à efeitos antiinflamatórios. Funções antiinflamatórias estão também relacionadas à supressão da síntese de TNF e interferon- γ (IFN γ). ACC, acetil-CoA carboxilase; GLUT4, transportador de glicose tipo 4; IKK, quinase do inibidor do fator nuclear κ B; NF- κ B, fator nuclear κ B; PPRE, elementos de resposta a proliferador de peroxissomo; SREBP1C, proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol; TNFR, receptor de TNF.

Uma forma de explicar a relação entre a ação da adiponectina, resistência insulínica e obesidade é partir da análise da fosforilação do AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), já que a ativação desta proteína leva à translocação de receptores insulínicos à membrana plasmática, além de promover oxidação de glicerídeos nos hepatócitos. Dado que o hormônio promove a fosforilação, já foi constatado que a queda de sua concentração sérica, que ocorre em indivíduos obesos, precede a manifestação de DM 2.

Os níveis de adipoQ variam por diversos motivos. Sabe-se que fatores como ser jovem, mulher, expor-se ao frio, possuir dieta rica em ácido linolênico e proteína de soja e não possuir acúmulos de gordura visceral correspondem a ter alta circulação do hormônio. Já obesidade, dieta rica em carboidratos e a própria diabetes reduzem a concentração sérica do hormônio por estresse oxidativo.

2.5 Detecção de Adiponectina

A detecção de adiponectina atualmente é realizada pelo método ELISA. Este é um teste imunoenzimático que permite a detecção e quantificação de proteínas, peptídeos, anticorpos e hormônios. Os testes são realizados em placas de plástico com 96 poços, e são baseados na interação altamente específica entre antígenos e anticorpos.

Em um ensaio do tipo sanduíche, utilizado devido a sua alta sensibilidade, o anticorpo específico para o antígeno de interesse é imobilizado nas placas. O antígeno, então entra em contato e liga-se com o anticorpo imobilizado. A detecção desta interação é feita através de anticorpos complexados com enzimas – as quais reagem com seus substratos, gerando um sinal que pode ser quantificado, como o valor de absorbância da amostra em um comprimento de onda determinado.¹¹⁰

Apesar da grande sensibilidade e confiabilidade envolvidas no método, os kits disponíveis comercialmente são caros (aproximadamente \$695,00)¹¹¹ e há a necessidade de tempo, de material e de trabalhadores especializados para a realização dos testes. Dessa maneira, o desenvolvimento de dispositivos de quantificação de adiponectina de baixo custo, rápidos e portáteis – como biossensores eletroquímicos - são de grande interesse para a área de diagnósticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do projeto é o de desenvolver um biossensor eletroquímico nanoestruturado para a quantificação do hormônio adiponectina através da imobilização de anticorpos anti-adipoQ e/ou receptores transmembrana AdipoR1/R2 em plataformas de ouro. Para isso, foram utilizados agentes reticulantes em conjunto com técnicas de síntese de filmes finos como a de monocamadas automontadas. A quantificação do hormônio se baseia na análise da resistência do filme biorreceptor, medida com o uso do marcador ferricianeto de potássio em conjunto com as técnicas de EIS e CV.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de uma nova classe de biossensores nanoestruturados através da imobilização de anticorpos anti-adipoQ ou de receptores AdipoR1/R2 que permita o monitoramento com alta seletividade e sensibilidade e a baixo custo dos níveis de adiponectina plasmática;
- Caracterização eletroquímica e óptica dos dispositivos biossensores;
- Comparação entre diferentes tipos de imobilização dos agentes de biorreconhecimento;
- Comparação entre as técnicas de detecção eletroquímica EIS e CV;
- Comparação entre os dispositivos construídos com anti-adipoQ e com receptores AdipoR1/R2;
- Realização de testes com plasma humano de pacientes em estados de saúde distintos, incluindo resistentes à insulina, obesos, com DM 2 e saudáveis;
- Estudar a relação entre a concentração de adiponectina e a condição de saúde dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modificação do Eletrodo

Substratos de ouro foram limpos utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sigma Aldrich), na razão de volumes de 3:1 (solução piranha). Em seguida, os eletrodos foram submetidos ao processo de voltametria cíclica em ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Sigma Aldrich) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizados 50 ciclos, de 0,0 a 1,8 V a 300 mV s^{-1} e, posteriormente, a 100 mV s^{-1} . Os substratos foram, então, lavados em MiliQ e secos sob um fluxo de N_2 .

Em seguida, os eletrodos de ouro foram funcionalizados para a detecção de adiponectina de maneira específica e eficiente. Primeiramente, os eletrodos foram revestidos com ácido 3-mercaptopropiônico (Sigma Aldrich), EDC (Sigma Aldrich) e NHS (Sigma Aldrich), usando a técnica de SAMs. Para isso, os eletrodos de ouro foram imersos em uma solução de ácido 3-mercaptopropiônico ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$, MiliQ) por 1 hora. O processo é então repetido com soluções de EDC ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2) e NHS (entre $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2). A última etapa da preparação dos eletrodos consiste na imobilização dos receptores transmembrana AdipoR1 e AdipoR2 ou dos anticorpos anti-adipoQ (Novus Biologicals Abnova). Os primeiros foram adsorvidos na superfície pela submersão do eletrodo de ouro por 2 horas em uma solução contendo $2,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $1,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente (Tris (tris(hidroximetil)aminometano) - HCl 50 mmol L^{-1} , pH 7,5). Já para a imobilização dos anticorpos, os eletrodos foram imersos por 1 hora e meia em uma solução de concentração $3,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (tampão fosfato salino (PBS) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4; contendo albumina do soro bovino (BSA) 0,1%, Sigma Aldrich). Após cada etapa, os eletrodos foram cuidadosamente lavados em MiliQ e secos sob um fluxo de N_2 .

Uma segunda técnica de imobilização dos agentes de reconhecimento biológico foi estudada. Nesta, os reagentes cisteamina e curcumina foram imobilizados sobre uma plataforma de ouro através da técnica SAM. Para isso, os eletrodos de ouro foram imersos em uma solução de cisteamina ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$, etanol, Sigma Aldrich) por 2 h. Em seguida, o processo foi repetido com uma solução de curcuminóides naturais – contendo, em maior parte, curcumina (75 ng

mL⁻¹, MiliQ, PDT Pharma, 1 h) e com a solução contendo os agentes biológicos, como especificado anteriormente. Após cada etapa, os eletrodos foram cuidadosamente lavados em MiliQ e secos sob um fluxo de N₂.

Soluções de adiponectina (Novus Biologicals Abnova) em tampão fosfato salino (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4, 0,1% BSA) foram usadas para os experimentos de detecção. Os eletrodos de ouro funcionalizados foram imersos na solução do hormônio por 2 h - no caso do biossensor baseado em anticorpos anti-adipoQ - e por 1,5 h - para o sensor baseado nos receptores AdipoR1 e AdipoR2.

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C).

Figura 8 - Montagem do dispositivo biossensor.

FONTE: Elaborada pelo autor.

4.2 Medidas Eletroquímicas

Medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato (Autolab, Metrohm) em uma cela de 3 eletrodos convencional. Os eletrodos de ouro modificados foram usados como eletrodo de trabalho (diâmetro de 2 mm), enquanto uma placa de platina (0,5 cm x 1,0 cm) e um eletrodo de Ag/AgCl (com solução interna KCl 3,0 mol L⁻¹) foram utilizados como contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. As medidas foram feitas

em 10 mL de tampão fosfato, 4,0 mmol L⁻¹ de ferricianeto de potássio (Sigma Aldrich), a temperatura ambiente (25°C). Antes de cada medida de impedância eletroquímica, uma CV foi feita a fim de ativar o sensor (-0,2 a 0,8 V, 100 mV s⁻¹, 2 ciclos). Os experimentos de EIS foram feitos em potencial zero. As medidas de CV foram realizadas na janela de potencial de -0,2 a 0,8 V a 100 mV s⁻¹, 2 ciclos. Antes de cada experimento, a solução foi agitada por alguns segundos, para garantir sua homogeneidade.

Para os estudos de estabilidade, foram realizados 50 ciclos sequenciais de CV. Já para os estudos de repetibilidade, 10 medidas de EIS e CV foram feitas em sequência, com agitação de alguns segundos entre os experimentos a fim de garantir a homogeneidade do eletrólito suporte. Os cálculos dos valores relativos à estabilidade e à repetibilidade foram baseados nos valores de corrente de oxidação do ferricianeto de potássio (no caso de CV) e em R_{tc} (no caso de EIS) e foram realizados por porcentagem. Em ambas as determinações o primeiro ciclo foi descartado para a realização dos cálculos. Três eletrodos distintos foram construídos para os experimentos de reprodutibilidade. Neste caso, os cálculos foram realizados utilizando porcentagem simples com base na corrente de oxidação do íon ferricianeto. Para os testes de estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade os eletrodos foram submetidos a uma concentração de adiponectina de 0,1 µmol L⁻¹. O teste de velocidade de varredura foi realizado em velocidades de 400 a 10 mV s⁻¹ e a corrente de oxidação do ferricianeto de potássio foi analisada em função da velocidade de varredura. Para a construção das curvas de calibração utilizamos as correntes de oxidação do íon marcador ferricianeto ou o valor de R_{tc} contra a concentração do hormônio em questão (entre 0,01 e 1,0 µmol L⁻¹). O limite de detecção foi estimado a partir do primeiro sinal detectável. Para isso, concentrações crescentes da ordem de nmol L⁻¹ foram testadas até ser possível diferenciar o sinal do branco e do analito.¹¹²⁻¹¹⁴ Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato contendo 4 mmol L⁻¹ de ferricianeto de potássio em temperatura ambiente (25°C). Para EIS foi utilizado potencial zero, com dois ciclos de CV (-0,2 a 0,8 V, 100 mV s⁻¹) anteriores para ativação do sensor. Para CV, os experimentos foram feitos na janela de potencial de -0,2 a 0,8 V, 100 mV s⁻¹.

4.3 Amostras de Plasma

Através de colaboração com o Dr. Alexandre da Costa Pereira, pesquisador no Instituto do Coração (InCor – HCFMUSP), foram obtidas 100 amostras de plasma humano de pacientes em diferentes condições de saúde. A partir da análise das características dos pacientes, 14 alíquotas de pacientes em diferentes condições de saúde foram selecionadas para o estudo do funcionamento do biossensor. As amostras foram divididas nos três seguintes grupos:

1) **Grupo Controle** (N=5):

- Adultos (20 a 60 anos)
- Não obeso (IMC < 30)
- Não diabético
- Níveis de colesterol dentro da normalidade
- Não hipertenso
- Não fumante
- Dieta balanceada

2) **Obesos** (N=4):

- Adultos (20 a 60 anos)
- Não fumantes
- Não hipertensos (preferencialmente)
- Obesos (IMC≥30)

3) **Diabéticos** (N=5):

- Adultos (20 a 60 anos)
- Não fumantes
- Não hipertensos (preferencialmente)
- Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

Neste estudo, o grupo de obesos foi idealizado como um conjunto de pacientes com tendência a desenvolver o DM 2. A tabela 1 resume as principais informações sobre cada amostra estudada.

Tabela 1: Divisão de grupos e detalhes de dados das condições de saúde dos doadores de plasma humano.

Grupo	Amostra	Sexo	Idade	IMC/ Obesidade	Sedentarismo	Diabetes	Glicemia capilar (mg/dL)
Controle	1	Masculino	31	25,94/Não	Sim	Não	84
	2	Masculino	42	22,62/Não	Sim	Não	76
	3	Masculino	23	23,9/Não	Sim	Não	-
	4	Feminino	42	24,72/Não	Sim	Não	76
	5	Feminino	49	20,76/Não	Sim	Não	57
Obesos	6	Masculino	52	33,44/Sim	Sim	Não	80
	7	Masculino	59	30,39/Sim	Sim	Não	64
	8	Masculino	77	38,66/Sim	Sim	Não	72
	9	Feminino	45	31,6/Sim	Sim	Não	54
Diabéticos	10	Masculino	34	32,11/Sim	Sim	Sim	182
	11	Feminino	66	33,37/Sim	Sim	Sim	119
	12	Feminino	49	-	Sim	Sim	139
	13	Feminino	56	-	Sim	Sim	-
	14	Masculino	63	-	Sim	Sim	-

FONTE: Elaborada pelo autor.

4.4 Kit ELISA

Para a realização do teste imunoenzimático ELISA, foi adquirido um kit de placas pré-revestidas para quantificação de Adiponectina Humana (Acrp 30), (Legend Max, BioLegend). O teste foi aplicado de acordo com as instruções presentes em seu manual.

4.5 Microscopia de Força Atômica

Medidas de microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas no microscópio Nanosurf FlexAFM utilizando uma ponta de silício TAP 190 (Ted Pella) no modo de contato intermitente. Foram utilizados substratos de vidro recobertos com uma camada de ouro (espessura aproximada de 40 nm) através da técnica de pulverização catódica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imobilização dos Agentes de Biorreconhecimento

A imobilização dos anticorpos anti-adipoQ e dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 na plataforma de ouro foi testada de duas maneiras. A primeira, já muito bem caracterizada e difundida na área de sensoriamento, faz uso dos agentes reticulantes EDC e NHS. A segunda técnica foi desenvolvida por nós, e utiliza curcumina para imobilizar os agentes biológicos em ouro. A fim de confirmar e caracterizar a imobilização dos reagentes, medidas de impedância eletroquímica foram realizadas ao final de cada etapa da funcionalização.

5.1.1 Imobilização Utilizando Curcumina

A abordagem em questão foi desenvolvida em conjunto com a colega do GNano (Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia), Valéria Spolon Maragoni. A idéia de utilizar curcumina para a imobilização dos agentes biosseletivos vem de suas propriedades moleculares e biológicas. Além desta apresentar nas extremidades funções químicas que permitem a imobilização dos agentes biosseletivos de forma estável, simples e rápida, este composto apresenta outras características interessantes para sua utilização como agente de imobilização. Estas incluem a presença de múltiplas duplas-ligações, levando a um filme de arquitetura organizada e consistente, deixando as extremidades opostas expostas para interação. Além disso, a presença de múltiplas duplas-ligações o torna um bom condutor eletrônico. Os possíveis mecanismos de reação da curcumina com os outros componentes do filme são discutidos a seguir e foram resumidos na Figura 9.

Inicialmente, o eletrodo de ouro foi funcionalizado com cisteamina. Nesta etapa, os grupos sulfeto da molécula interagem com o ouro, deixando a amina disponível para interação. Ao adicionarmos a curcumina à reação, esta pode se ligar, preferencialmente, utilizando dois mecanismos: a) ligação de hidrogênio e b) ataque nucleofílico e formação de ligação covalente. No caso (a), a imobilização se baseia na interação entre o hidrogênio da amina presente na cisteamina e o

oxigênio de uma das extremidades da molécula de curcumina. Pode também haver ligação de hidrogênio entre o H e o N dos grupos funcionais já citados. O mecanismo (b) ocorre através de um ataque nucleofílico pelo grupamento hidroxila da curcumina ao carbono imediatamente anterior à amina, formando uma ligação covalente entre o oxigênio e o carbono e liberando NH_3 em solução. A força da ligação entre os compostos, neste caso, é maior do que se for comparada com o mecanismo (a). Os agentes biosseletivos são imobilizados através de seus grupamentos amina na extremidade oposta da curcumina, pelos mesmos mecanismos citados.

O favorecimento de um mecanismo ou outro é dependente de fatores como o tempo de imersão do eletrodo, pH da solução e temperatura. Para os experimentos de imobilização aqui realizados, os eletrodos foram imersos por 1h na solução de curcumina, em temperatura ambiente (25°C) – o que favorece o mecanismo (a). Possíveis alternativas para favorecer o mecanismo (b) seriam diminuir o pH da solução e aumentar o tempo de imersão do eletrodo. Para a determinação exata do mecanismo de imobilização, medidas de FTIR podem ser aplicadas.

Figura 9 - Possível mecanismo da imobilização de curcumina à plataformas de ouro e de sua interação com agentes biosseletivos.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Um diagrama de Nyquist representando a montagem do biossensor utilizando curcuminóides naturais e os receptores AdipoR1 e AdipoR2 é mostrado na Figura 10. Observa-se que a cada etapa de imobilização o diâmetro do semi-círculo muda

– indicando, assim, que a resistência relativa ao filme alterou e que a modificação desejada foi atingida.

Inicialmente, ao realizarmos a medida de impedância com o ouro limpo, observamos uma reta (verde), correspondente aos efeitos de difusão do marcador (ferricianeto de potássio). Após a imobilização da cisteamina (vermelho), observa-se a formação de um semi-círculo de diâmetro próximo a 8 k Ω , relacionado à resistência do filme formado sobre o eletrodo. Em seguida, a curcumina reage com a cisteamina e a curva em preto é observada. Nesta etapa, verifica-se uma queda na resistência do filme biorreceptor. Sendo assim, a curcumina está facilitando a transferência dos elétrons para a superfície do eletrodo de ouro. Em seguida, foi feita a imobilização dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 (azul). Como os receptores transmembrana são compostos predominantemente de aminoácidos hidrofóbicos, estes apresentam carga neutra. Estes componentes são consideravelmente maiores do que os agentes reticulantes, então o grande aumento de resistência do filme provavelmente advém de impedimento estérico.

Neste caso, a curva obtida para a detecção do hormônio (rosa) ($3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de adiponectina) é muito semelhante à curva do eletrodo em sua montagem completa (azul). Esta baixa mudança de resistência do filme antes e depois da ligação de adiponectina pode ser explicada principalmente pela grande espessura do filme biorreceptor. A chegada dos elétrons à plataforma de ouro é fortemente bloqueada após a imobilização dos receptores transmembrana, e a ligação ou não dos receptores ao hormônio modifica em pequena magnitude a R_{tc} – levando à perda de sensibilidade e ao aumento do limite de detecção.

Figura 10 - Diagrama de Nyquist da construção do biossensor utilizando Cistamina/Curcumina e os receptores AdipoR1 e AdipoR2.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Imobilização Através dos Agentes Reticulantes EDC/NHS

A utilização dos agentes reticulantes EDC/NHS em conjunto com o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) para a construção de biossensores é muito comum na literatura. O mecanismo de imobilização está resumido na Figura 11 e ocorre da seguinte maneira:

Uma ligação covalente se forma entre o grupo sulfeto do 3-MPA e o ouro, deixando o grupo ácido carboxílico disponível para a reação com o EDC e o NHS. A reação, então, segue da seguinte forma: primeiramente, o EDC reage com grupos carboxílicos e é formado um grupo intermediário chamado O-acilisouréia, o qual é instável e reativo. A partir deste ponto, a reação pode seguir três diferentes cursos.

a) caso uma amina primária esteja disponível para reação, esta forma uma ligação

amida com o grupo carboxílico original e um produto secundário do EDC é liberado como um derivado solúvel de uréia. b) o intermediário do EDC reage com o NHS, o qual se liga através do grupo ácido carboxílico original. Neste caso, um grupo reativo a amina que é consideravelmente mais estável do que o O-acilisouréia se forma c) caso o intermediário não reaja quase imediatamente, este irá sofrer hidrólise e o grupo carboxílico original se restaura. Quando utiliza-se o EDC combinado de NHS, o caminho de reação b é o favorecido. Em seguida, aminas primárias do componente a ser imobilizado removem o NHS, liberando-o em solução, e se ligam ao ácido carboxílico original.^{48-49,115}

Figura 11 - Mecanismo de reação dos agentes de reticulação EDC e NHS. Neste caso, o esquema de reação está exemplificado para um substrato de ouro funcionalizado com ácido 3-mercaptopropiônico.

FONTE: Elaborada pelo autor.

A montagem do biossensor através da utilização dos agentes reticulantes EDC e NHS também pode ser confirmada através do diagrama de Nyquist presente na Figura 12. Assim como observado anteriormente, ambos os filmes sofreram mudanças em sua resistência a cada etapa de imobilização – indicando ligação do

material desejado. Neste caso, a resistência do filme relativa ao íon marcador aumentou a cada etapa de montagem tanto para o biossensor baseado nos receptores quanto no baseado em anticorpos – o que indica que nenhuma das camadas do filme nanoestruturado apresenta alta densidade de cargas positivas.

A maioria dos anticorpos, inclusive o aqui utilizado, possui carga superficial positiva.¹¹⁶ O aumento na resistência do filme, na etapa de imobilização dos anticorpos, pode ser explicado pela presença de BSA no tampão usado para diluição. O BSA, neste caso, é aplicado tanto para aumentar o tempo de armazenamento útil dos agentes biológicos quanto para interagir com as extremidades livres dos agentes reticulantes, evitando reações inespecíficas posteriores. Como em pH fisiológico o BSA apresenta carga negativa¹¹⁷, o aumento da resistência do filme ocorre devido à sua presença. Foram realizados testes de imobilização do anticorpo na ausência de BSA e neste caso, como esperado, foi observada uma redução da resistência do filme biorreceptor devido às cargas superficiais positivas do anti-adipoQ.

Em ambas as montagens, a diferença entre as curvas de detecção do hormônio (vermelha para os receptores e preta para o anticorpo) e de montagem completa do biossensor (verde para os receptores e vermelha para os anticorpos) mostraram grande discrepância quanto à resistência do filme. Dessa maneira, a utilização de 3-MPA/EDC/NHS para a imobilização dos agentes biológicos se mostrou mais adequada para o desenvolvimento de biossensores com limites de detecção mais baixos e com potencial de utilização nas concentrações de adiponectina existentes em plasma humano.

A fim de comparar os nossos resultados com a literatura, foi realizada uma busca por sensores semelhantes. Entre os principais resultados, temos o biossensor desenvolvido por Kim e colaboradores¹¹⁸ para a detecção de estrogênio através da imobilização de seus receptores com 3-MPA/EDC/NHS em plataformas de ouro. O artigo apresenta o diagrama de Nyquist para cada etapa de montagem de seu dispositivo, e este possui a mesma forma e valores de mesma ordem aos obtidos no projeto aqui desenvolvido. A principal fonte de diferença nos valores provavelmente advém de diferenças no eletrodo de ouro utilizado (área e modelo distintos) além, claro, de diferenças no receptor e hormônio utilizados.

Figura 12 - Detecção de adiponectina pela técnica de EIS. Diagramas de Nyquist para as medidas realizadas em cada etapa de montagem do eletrodo a) 3-MPA/EDC/NHS/Receptores e b) 3-MPA/EDC/NHS/Ab.

FONTE: Elaborada pelo autor.

A fim de garantir a especificidade do biossensor desenvolvido, precisa-se certificar que a interação do analito se dá com os agentes biosseletivos, altamente específicos, e não com os agentes de imobilização. Para isso, foi realizado um teste de negativo através da montagem do eletrodo sem os agentes biológicos. Medidas de EIS foram feitas em diferentes etapas de montagem do biossensor e, em seguida, uma medida foi feita após a interação com o hormônio. O diagrama de Nyquist obtido indica que não houve mudança da curva antes e após a interação com a adiponectina. Dessa maneira, foi verificado que os agentes biosseletivos são de fato responsáveis pela detecção do hormônio e os elementos de ligação não interferem. O biossensor para adiponectina aqui desenvolvido apresenta baixa taxa de ligação cruzada e possui ótima especificidade para o hormônio de interesse.

5.2 Otimização do Biossensor

Após a determinação do método de imobilização dos agentes biológicos, realizou-se a otimização de seu protocolo ao biossensor desenvolvido. Para cada um dos componentes do filme dois importantes parâmetros foram investigados: sua concentração ideal e o tempo mínimo para que a reação de imobilização ocorra.

O estudo da concentração é de vital importância para a especificidade e sensibilidade do eletrodo. Se a solução contendo as moléculas a serem imobilizadas estiver em uma concentração abaixo da ideal, a tendência é a de que as moléculas imobilizadas fiquem espaçadas, facilitando reações de compostos inespecíficos com o eletrodo ou com camadas imobilizadas anteriormente. Já se a solução estiver em uma concentração muito alta, as moléculas imobilizadas tendem a ficar bem próximas, muitas vezes dificultando a interação do composto de interesse através de impedimento estérico.

O estudo do tempo mínimo necessário para que a reação de imobilização se complete é importante para garantir que a reação não será interrompida em seu curso, e que toda a superfície do eletrodo esteja recoberta uniformemente. Além disso, o estudo deste parâmetro contribui para que o biossensor seja produzido no menor tempo possível, facilitando sua produção e seu uso.

As concentrações iniciais dos materiais utilizados na funcionalização foram retiradas da literatura ¹¹⁹⁻¹²¹ e correspondem aos seguintes valores: 1 mmol L⁻¹ 3-MPA, 5 mmol L⁻¹ EDC e 8 mmol L⁻¹ NHS. A concentração inicial dos agentes biológicos selecionada foi de 3,3 ng µL⁻¹. Esta foi escolhida principalmente porque a concentração de adiponectina sérica típica é de ordem semelhante e pela disponibilidade de material para a realização do experimento. Inicialmente, o eletrodo permanecia imerso por 2 h nas soluções de cada componente do filme – período necessário para completar as reações de imobilização, segundo um estudo dos grupamentos químicos envolvidos na reação. Para os testes de otimização do biossensor a resposta do eletrodo funcionalizado foi avaliada para valores próximos aos iniciais.

Os testes relacionados à otimização do biossensor foram realizados com adiponectina obtida a partir de ratos, devido à baixa disponibilidade do hormônio de origem humana – o qual foi reservado para os experimentos de calibração do biossensor.

5.2.1 Otimização do Ácido 3-Mercaptopropiônico

Inicialmente, realizaram-se testes para a otimização da concentração do ácido 3-mercaptopropiônico. Para isso, os biossensores foram montados com soluções de 3-MPA de diferentes concentrações (entre 0,25 e 1,5 mmol L⁻¹) e a detecção do hormônio a 10⁻⁸ mol L⁻¹ foi registrada. Para cada uma das concentrações de ácido, foram realizadas três medidas de detecção do hormônio. A média dos valores de R_{tc} após o contato com o hormônio foi plotada em função da concentração de 3-MPA e pode ser visualizada na

Figura 13. Os experimentos relativos a outros componentes do filme foram realizados de maneira semelhante.

Para o biossensor baseado nos anticorpos, a resistência do filme apresenta um pico na concentração de 0,75 mmol L⁻¹ e depois volta a subir em concentrações altas (1,50 mmol L⁻¹). A obtenção de valores altos de R_{tc} após a interação com o hormônio levam a uma maior diferença no sinal antes e após a detecção. Assim, a concentração de 0,75 mmol L⁻¹, neste caso, nos fornece um biossensor possivelmente com maior sensibilidade, apresentando espaçamento e condições adequadas de interação do hormônio e do filme.

Para o biossensor construído com os receptores transmembrana, é possível visualizar claramente um aumento nos valores de R_{tc} para concentrações de ácido acima de 0,25 mmol L⁻¹. O valor de 0,75 mmol L⁻¹ representa um pico local, e as concentrações de 1 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹ apresentam resultados semelhantes a este. Como o sensor construído com 0,75 mmol L⁻¹ de ácido mostrou o melhor desempenho no caso dos anti-adipoQ, esta foi a concentração escolhida para ambos – facilitando a comparação entre estes.

Figura 13 - Estudo da relação entre a concentração de 3-MPA e a resistência do filme na detecção de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de adiponectina. a) eletrodo funcionalizado com Anti-AdipoQ; b) eletrodo funcionalizado com AdipoR1 e AdipoR2.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Foram realizados experimentos para a determinação do tempo mínimo de imersão do eletrodo na solução de 3-MPA ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$). O gráfico da Figura 14 mostra que, a partir de 30 minutos de imersão do eletrodo de ouro a reação está completa. A fim de garantir a homogeneidade dos diferentes eletrodos utilizados e diminuir desvios experimentais no desenvolvimento do sensor, o tempo escolhido para imersão em 3-MPA foi de 1 hora – garantindo, assim, que a reação estaria completa em plataformas de ouro distintas.

Figura 14 - Estudo do tempo mínimo necessário para a funcionalização do eletrodo de ouro com 3-MPA. O gráfico relaciona a mudança de resistência no filme ao tempo de reação.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Otimização dos Agentes Reticulantes EDC/NHS

O gráfico que resume a investigação do tempo de imobilização dos agentes reticulantes EDC e NHS está mostrado na Figura 15. Observa-se que a partir de 1 hora a reação está completa. Neste caso, a concentração dos componentes não foi investigada. Isso porque tanto o EDC quanto o NHS não fazem parte da estrutura final do filme biorreceptor. Estes auxiliam na formação da ligação entre os agentes biológicos e o 3-MPA; após esta ser formada, compostos secundários do EDC e NHS são liberados em solução. Assim, o eletrodo funcionalizado com 3-MPA é imerso em uma solução contendo os agentes EDC/NHS em excesso – garantindo que praticamente todas as moléculas de 3-MPA imobilizadas sejam funcionalizadas e possam se ligar com os agentes biosseletivos.

Figura 15 - Relação entre a resistência do filme contendo EDC/NHS e o tempo de reação.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Otimização dos Agentes Biosseletivos

Em seguida, a concentração ideal dos agentes biosseletivos foi estudada. Para isso, medidas de impedância foram realizadas para concentrações entre 1 e 5

ng μL^{-1} . O gráfico da concentração dos agentes biosseletivos contra R_{tc} é exibido na Figura 16. Neste caso, foi observado um pico expressivo na concentração de 3,3 ng μL^{-1} , tanto para os biossensores contendo anticorpos, quanto para os baseados nos receptores. Como os receptores adipoR1 e adipoR2 apresentam massa molar teórica de 69¹²² e 70,3 kDa¹²³, respectivamente, a concentração total de receptores em solução em 3,3 ng μL^{-1} é de $4,7 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} . Para a realização dos cálculos relativos a solução de anticorpos anti-adipoQ, foi utilizado o peso molecular médio de um IgG intacto – 150 kDa.¹²⁴ Neste caso, a solução de 3,3 ng μL^{-1} corresponde a $2,2 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} . Os anticorpos, porém, apresentam duas extremidades capazes de interagir com o antígeno. Assim, a concentração de cadeias que interagem com adiponectina corresponde ao dobro da concentração de anticorpos: $4,4 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} . Este valor é muito próximo do obtido para os receptores, reforçando que esta é a melhor concentração dos agentes biosseletivos para interação com adiponectina na faixa de concentrações analisada.

O pico no gráfico pode ser explicado da seguinte maneira: 1) Para concentrações abaixo da ideal, a ausência de bioreceptores leva a um decaimento no sinal da detecção do hormônio e 2) para concentrações acima da ideal, a aglomeração dos agentes de reconhecimento leva a um impedimento estérico para a reação entre estes e o analito – diminuindo, assim, o sinal na detecção.

Figura 16 - Estudo da concentração ideal de agentes biosseletivos. Os gráficos relacionam a resistência do filme na detecção de adiponectina a 10^{-8} mol L^{-1} com a respectiva concentração de a) anti AdipoQ e b) AdipoR1/R2 utilizada na montagem.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Em seguida, o tempo de imobilização de cada um dos componentes foi testado. O gráfico do tempo de imobilização contra R_{tc} pode ser visualizado na Figura 17. Observamos uma tendência à estabilização de R_{tc} após 1,5 h para os anticorpos anti-adipoQ. Já para os receptores AdipoR1/R2, o tempo de imobilização escolhido foi o de 2 h. Isso porque este apresenta o menor erro associado, e estes se encontram dentro da faixa de erro do eletrodo imerso pelo tempo máximo (3 h).

Figura 17 - Estudo do tempo mínimo necessário para a imobilização dos agentes de bioreconhecimento ao eletrodo. a) Anti-AdipoQ; b) AdipoR1/AdipoR2.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.2.4 Otimização da Detecção do Hormônio Adiponectina

Por fim, foi investigado o tempo necessário para a interação entre o biossensor totalmente montado e o hormônio adiponectina (10^{-8} mol L⁻¹). Os resultados são expostos na Figura 18. Neste caso, o tempo de 2 h foi o escolhido para os anticorpos e 1,5 h para os receptores.

Figura 18 - Estudo do tempo necessário para interação dos a) anticorpos e b) dos receptores com o hormônio adiponectina (10^{-8} mol L $^{-1}$).

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.3 Caracterização do Biossensor

Após a escolha do método de imobilização dos anticorpos anti-adipoQ e dos receptores AdipoR1 e AdipoR2, realizamos a caracterização eletroquímica e óptica do biossensor. Estas incluíram testes de reprodutibilidade, estabilidade voltamétrica, repetibilidade e microscopia do filme biorreceptor.

5.3.1 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade na construção e na detecção de adiponectina (10^{-7} mol L $^{-1}$) foi investigada através da comparação de construções realizadas em paralelo, em três eletrodos de ouro distintos através das técnicas eletroquímicas EIS e CV. Para os biossensores baseados em EIS, o diagrama de Nyquist de cada uma das etapas pode ser visto na Figura 19. O valor médio de R_{tc} foi calculado para cada conjunto de medidas, como também o desvio padrão (Tabela 2). Os desvios encontrados são relativamente baixos e dentro da normalidade para medidas de impedância eletroquímica.^{118,125-126} As principais fontes de desvio incluem:

- a) Diferenças no preparo das soluções de EDC/NHS, anticorpos, receptores e adiponectina, refeitas todos os dias;
- b) Obtenção manual dos valores de R_{tc} , através do software FRA (Autolab). Caso existisse uma ferramenta automatizada para esta tarefa, provavelmente os desvios associados à R_{tc} iriam diminuir;
- c) A medida da impedância, realizada de maneira indireta;
- d) A alta adsorção de ferricianeto de potássio nas moléculas biológicas presentes no filme.

Tabela 2 - Valor médio da resistência do filme e o desvio padrão associado obtido pela técnica EIS para cada etapa de montagem do biossensor e na detecção de adiponectina. Três eletrodos distintos foram utilizados na investigação da reprodutibilidade.

Componente	R_{tc} médio (Ω)	Desvio Padrão (Ω)	Desvio padrão (% em relação à média)
3-MPA	544	31,7	5,9
EDC NHS	841	9,2	1,1
Ab	7220	767,3	10,6
Receptores	6690	226,4	3,4
Detecção de Adiponectina (Ab)	22500	469,6	2,1
Detecção de Adiponectina (Receptores)	18000	1016,1	5,6

FONTE: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Reprodutibilidade na montagem e na detecção de adiponectina pela técnica EIS. Para a realização deste estudo, três construções foram realizadas em paralelo.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Os voltamogramas e valores relacionados ao estudo de reprodutibilidade utilizando CV se encontram resumidos na Figura 20 e na Tabela 3.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos relativos ao estudo de reprodutibilidade utilizando a técnica CV. Diferentes etapas de montagem e a detecção de adiponectina (10^{-7} mol L $^{-1}$) foram estudadas através da construção paralela de 3 biossensores.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Estudo da reprodutibilidade na construção de biossensores utilizando a técnica CV. Valores relativos à corrente média do pico de oxidação e seu desvio padrão associado são apresentados para cada etapa de montagem do eletrodo e para a detecção de adiponectina (10^{-7} mol L⁻¹).

Componente	I _{pico} médio (μA)	Desvio Padrão (μA)	Desvio padrão (% em relação à média)
3-MPA	17,7	0,216	1,2
EDC NHS	17,8	0,252	1,4
Ab	9,02	0,039	4,3
Receptores	11,3	0,214	1,9
Detecção de Adiponectina (Ab)	8,03	2,257	28,1
Detecção de Adiponectina (Receptores)	9,03	0,156	1,7

FONTE: Elaborada pelo autor.

Foi observada uma boa reprodutibilidade, e a técnica que apresentou melhores resultados foi a de CV e de receptores transmembrana (desvio de 1,73%). Sensores baseados em CV apresentando valores semelhantes podem ser encontrados na literatura^{13,127-128} Os desvios associados às medidas são, em grande maioria, mais baixos do que os obtidos com a técnica de EIS – provavelmente pelos motivos previamente apresentados.

Para a detecção de adiponectina utilizando anticorpos, um grande desvio (ca. 28%) foi observado. Isso pode indicar instabilidade do eletrodo após a adição de adiponectina. É possível que o filme esteja se desestruturando devido à força de ligação entre os compostos, gerando assim uma grande diferença entre medidas.

5.3.2 Estabilidade

A estabilidade do biossensor foi investigada através da realização de 50 ciclos sucessivos na voltametria cíclica na presença de 10^{-7} mol L⁻¹ de adiponectina. Os

voltamogramas cíclicos podem ser visualizados na Figura 21. Os experimentos mostraram que a construção baseada nos receptores é mais estável se comparada à que utiliza anticorpos anti-adipoQ. Enquanto a primeira apresentou uma variação na corrente do pico de oxidação de apenas 8,04% em 50 ciclos, a última apresentou variações de 58,44% nas mesmas condições. Dessa maneira, novamente a funcionalização utilizando os agentes AdipoR1/R2 se mostrou mais adequada. A estabilidade apresentada pelos receptores foi melhor do que a encontrada para biossensores semelhantes na literatura. Por exemplo, o artigo de Mallouf e colegas descreve um sensor para detecção de bactérias por impedância eletroquímica e possui um decaimento no sinal de 17,24% em 50 ciclos.⁴⁴

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do estudo de estabilidade das construções contendo a) receptores AdipoR1/R2 e b) anticorpos anti-adipoQ.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.3.3 Repetibilidade

Para investigar a repetibilidade do biossensor, foram realizadas medidas de voltametria cíclica sequenciais na presença de 10^{-7} mol L⁻¹ de adiponectina. A relação entre a corrente-resposta e o número de medidas foi investigada e pode ser visualizada na Figura 22. No caso dos receptores transmembrana, observamos um decaimento na resposta do biossensor de 15,97% após 9 medidas, enquanto o decaimento para os anticorpos nas mesmas condições foi de 31,44%. Novamente o

biossensor baseado nos receptores apresentou melhores características para desenvolvimento. Rezaei e colaboradores indicaram valores de repetibilidade próximos, apresentando um decaimento de 11,54% após 9 medidas.¹²⁵

Figura 22 - Estudo da corrente-resposta em medidas sucessivas de CV. a) receptores AdipoR1/R2; b) anticorpos anti-adipoQ.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.3.4 Velocidade de Varredura

Para a determinação do processo que rege a transferência de cargas na superfície do eletrodo, realizou-se um experimento com diferentes velocidades de varredura. Os resultados podem ser observados na Figura 23. Observou-se um aumento linear na corrente do pico de oxidação do ferricinetto de potássio em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura – o que indica que a transferência de cargas é regida por processos difusionais.

Figura 23 - Teste de velocidade de varredura. Eletrodo de ouro recoberto com 3-MPA/EDC NHS/Receptores/ 10^{-7} Adiponectina na presença de 4 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio.

FONTE: Elaborada pelo autor.

O coeficiente de difusão (D) pode ser estimado pelo gráfico de $I_p \times v^{1/2}$ de acordo com a equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = 2,687 \times 10^5 n^{3/2} v^{1/2} D^{1/2} AC$$

sendo n o número de elétrons transferido na reação de óxido-redução, C a concentração da espécie sofrendo a reação, A a área do eletrodo, V a velocidade de varredura e I_p a corrente no pico de reação. Neste caso estamos analisando a oxidação do ferricianeto de potássio. Temos $n = 1$, $C = 4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $A = 3,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Através de uma média para os distintos valores de velocidade de varredura v , D foi estimado em $5,267 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

5.3.5 Microscopia de Força Atômica

A fim de verificar a adesão dos materiais no filme biorreceptor através de técnicas distintas de eletroquímica, realizamos medidas de AFM. Este método foi escolhido principalmente por ser uma ótima ferramenta para obtenção de imagens de alta resolução em escala nanométrica, além de ser uma técnica não destrutiva. Imagens de topografia e fase foram realizadas para cada etapa de imobilização dos filmes e as últimas podem ser vistas na Figura 25. Uma interpretação mais precisa dos resultados pode ser realizada através da análise de valores RMS de rugosidade na Tabela 4.

Observamos uma diminuição nos valores RMS de rugosidade e um aumento na variação da fase conforme adicionamos novas camadas ao filme biorreceptor. A diminuição da rugosidade média pode ser explicada pelo fato do ouro ser um substrato com imperfeições – o filme então está sendo depositado principalmente nas partes mais baixas das irregularidades, fazendo com que o filme fique cada vez mais homogêneo com a adição de material. O aumento na variação de fase era um fenômeno já esperado, já que, no AFM, a fase está diretamente ligada à natureza do material analisado. Assim, o aumento na variação de fase corresponde à adição de materiais distintos na amostra. Ambos os resultados indicam que o filme biorreceptor está sendo depositado de maneira adequada. Uma única exceção ocorreu na diminuição da variação de fase ao adicionarmos o anticorpo – o que pode ter ocorrido devido ao recobrimento completo da superfície com os elementos biológicos.

Figura 24 - Topografia do filme biorreceptor 3-MPA/EDC NHS/AdipoR1 e AdipoR2

FONTE: Elaborada pelo autor.

Figura 25 - Microscopia de força atômica, fase. a)ouro limpo; b)3-MPA; c)3-MPA/EDC NHS; d)3-MPA/EDC NHS/Receptores; e)3-MPA/EDC NHS/Anticorpos;

FONTE: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Resumo dos valores RMS de rugosidade e fase para cada uma das etapas de montagem do filme.

Amostra	RMS Rugosidade (nm)
Au	0,849
3-MPA	0,826
EDC NHS	0,640
Receptores	0,629
Anticorpos	0,579

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.4 Detecção de Adiponectina

Utilizando a montagem 3-MPA/EDC/NHS/Agente de biorreconhecimento, a resposta dos biossensores foi testada frente à diferentes concentrações de adiponectina (entre 10^{-8} e 10^{-6} mol L⁻¹), incluindo a taxa típica de adiponectina sérica. Para isso, utilizou-se tanto a técnica eletroquímica EIS quanto a CV, e estas foram comparadas. Inicialmente, a resposta dos biossensores foi testada utilizando adiponectina de roedores e, em seguida, para uma análise mais aprofundada, foi utilizada adiponectina humana.

5.4.1 Adiponectina de Roedores

Através do uso da técnica de EIS e dos receptores AdipoR1 e AdipoR2, obtivemos o diagrama de Nyquist e a curva de calibração presentes na Figura 26a. Foi observada uma relação linear entre R_{tc} e a concentração de adiponectina (entre 0,025 e 1,0 μ mol L⁻¹, dentro da faixa de normalidade para o plasma humano), com um R^2 de 0,983. Este comportamento era esperado, já que os receptores AdipoR1 e AdipoR2 são eletricamente neutros, e a adiponectina é predominantemente carregada negativamente¹²⁹ – assim, quanto maior o número de moléculas do

hormônio ligadas ao filme, maior a resistência deste ao marcador ferricianeto de potássio, também negativo. A sensibilidade calculada para este caso foi de $1,3 \times 10^6$ ohm L μmol^{-1} cm⁻².

O mesmo estudo foi realizado utilizando anticorpo anti-adipoQ como o agente de reconhecimento do hormônio. Os resultados estão expostos na Figura 26b. A curva apresentou um comportamento semelhante, tendo relação linear entre R_{tc} e a concentração de adiponectina (entre 0,01 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), R^2 de 0,868 e sensibilidade $-1,3 \times 10^6$ ohm L μmol^{-1} cm⁻². Neste caso, porém, R_{tc} decresce com o aumento da concentração do hormônio – diferindo do que esperávamos. Apesar da literatura não fornecer dados que expliquem completamente este comportamento, possíveis explicações são:

- a) A adiponectina (que apresenta carga negativa em seu ambiente nativo) pode expor, ao interagir com o anticorpo, uma região com carga positiva; isso pode ocorrer devido à natureza de sua interação com o anticorpo, o modo espacial de ligação das moléculas ou por simples atração de cargas (a carga negativa do hormônio pode se acumular em torno do anticorpo positivo, deixando sua extremidade livre para a solução também positiva). Assim, o íon-marcador, de carga negativa, sente menor resistência quanto menos adiponectina houver em solução. Neste caso, porém, a adiponectina deve apresentar carga, em módulo, maior do que a do anticorpo sem interação.
- b) A interação eletrostática entre anticorpo e antígeno pode ser mais forte do que a interação entre o anticorpo e os agentes de imobilização. Sendo assim, quando existir adiponectina, parte dos anticorpos tende a se soltar do eletrodo de ouro – diminuindo a resistência do filme com o aumento da concentração do hormônio.

Figura 26 - Resposta do eletrodo de ouro funcionalizado com 3-MPA/EDC/NHS/Agentes biológicos frente à diferentes concentrações de adiponectina na forma de diagramas de Nyquist e suas respectivas curvas de calibração. a) Anticorpos anti-AdipoQ e b) Receptores AdipoR1 e AdipoR2.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Curvas de calibração foram também obtidas através da técnica de CV tanto para os biossensores baseados nas proteínas transmembrana quanto nos anticorpos. Estas podem ser visualizadas na Figura 27 a e b, respectivamente. Neste caso, monitorou-se a relação entre a corrente do pico de oxidação de ferricianeto de potássio e a concentração de adiponectina. O aumento da resistência do filme leva a diminuição na corrente do pico de oxidação, como também ao deslocamento deste para potenciais mais elevados.

Ambos os dispositivos apresentaram uma resposta linear contra a variação de concentração de adiponectina: entre 0,025 e 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os receptores e 0,025 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os anticorpos; com R^2 de 0,989 e 0,993, respectivamente. A sensibilidade calculada, neste caso, foi de $-9,1 \times 10^{-5} \text{ A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para os

eletrodos baseados em receptores e $1,4 \times 10^{-4} \text{ A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para os baseados em anticorpos.

Como esperado, obteve-se uma concordância nos resultados pela técnica de CV e por EIS – ou seja, o aumento (no caso dos receptores) ou diminuição (no caso dos anticorpos) da resistência do filme com o aumento da concentração de adiponectina pode ser observado por duas técnicas distintas, confirmando os resultados. Ambas as técnicas apresentaram linearidade na resposta em relação a faixa de concentração de hormônio testada, porém a CV gerou curvas com melhor R^2 . Os valores calculados para a sensibilidade foram semelhantes dentro de cada técnica. Entre as as combinações testadas, a que apresentou melhor coeficiente linear dentro das concentrações séricas típicas fez uso de anticorpos anti-adipoQ em conjunto com CV. Esta, porém, apresentou baixa reprodutibilidade, com desvio padrão próximo a 30%. Assim, o biossensor mais adequado à quantificação de adiponectina sérica foi o que fez uso de receptores em conjunto com CV. Este sensor foi capaz de quantificar adiponectina em grande parte da faixa de concentrações existente em plasma humano - caso necessário, as amostras podem ser diluídas para serem adequadas ao sensor. Além disso, este apresentou alta reprodutibilidade e linearidade.

Tabela 5 - Resumo dos parâmetros relacionados à detecção do hormônio Adiponectina para os sensores desenvolvidos com base no filme 3-MPA/EDC/NHS/Agente de biorreconhecimento.

Biossensor	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$ de adiponectina)	R^2	Sensibilidade	Reprodutibilidade
Ab/EIS	0,01 a 0,10	0,868	$-1,3 \times 10^6 \text{ ohm } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	2,1%
Receptores/EIS	0,025 a 1,0	0,983	$1,2 \times 10^6 \text{ ohm } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	5,6%
Ab/CV	0,025 a 1,0	0,993	$1,4 \times 10^{-4} \text{ A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	28,1%
Receptores/CV	0,025 a 0,75	0,989	$-9,1 \times 10^{-5} \text{ A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	1,8%

FONTE: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Resposta do eletrodo de ouro funcionalizado com 3-MPA/EDC/NHS/Agentes biológicos frente à diferentes concentrações de adiponectina na forma de voltamogramas cíclicos e suas respectivas curvas de calibração. a) Anticorpos anti-AdipoQ e b) Receptores AdipoR1 e AdipoR2.

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.4.2 Adiponectina Humana

As curvas de calibração foram obtidas utilizando os componentes biológicos de origem humana. Três medidas foram feitas para cada uma das concentrações do hormônio, e a média dos valores foi utilizada para a construção dos gráficos. Como esperado, já que a adiponectina de roedores e a humana possuem as mesmas características básicas em termos de estrutura e de carga, as tendências observadas em cada experimento foram as mesmas.

Para o sensor baseado nos receptores AdipoR1/R2 e em EIS, obteve-se uma resposta linear entre 10^{-8} mol L⁻¹ e $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de adiponectina ($R^2=0,854$), com sensibilidade de $1,2 \times 10^6$ ohm L μmol^{-1} cm⁻² e limite de detecção de 7×10^{-9} mol

L^{-1} . Para o sensor baseado em anticorpos e EIS, a faixa linear variou entre 10^{-8} e 10^{-6} $mol\ L^{-1}$, com $R^2=0,963$. Sua sensibilidade foi calculada em $-4,8 \times 10^6$ $ohm\ L\ \mu mol^{-1}\ cm^{-2}$ e seu limite de detecção 5×10^{-9} $mol\ L^{-1}$. Os diagramas de Nyquist e as curvas de calibração podem ser visualizadas na Figura 28. O alto erro associado às medidas sucessivas ocorre principalmente devido à alta taxa de adsorção do íon marcador pelas moléculas biológicas.

Figura 28 - Diagramas de Nyquist e curvas de calibração obtidas pelo biossensor construídos em ouro com a) 3-MPA/EDC/NHS/Receptores b) e 3-MPA/EDC/NHS/Ab.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Os voltamogramas cíclicos e a curva de calibração relacionadas ao sensor baseado tanto nos receptores quanto nos anticorpos podem ser visualizados na Figura 29 a e b, respectivamente. Os sensores apresentaram ampla faixa linear - entre 10^{-8} a $7,5 \times 10^{-7}$ $mol\ L^{-1}$ de adiponectina ($R^2=0,992$) para os receptores e 10^{-8} a 10^{-6} $mol\ L^{-1}$ de adiponectina ($R^2=0,945$) para os anticorpos anti-adipoQ, respectivamente. A sensibilidade e o LD apresentados por estes foi de $6,3 \times 10^{-5}$ A L

$\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-9} \text{mol L}^{-1}$ para os anticorpos e $-7,6 \times 10^{-5} \text{A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e $7,0 \times 10^{-9} \text{mol L}^{-1}$ para os receptores.

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes concentrações de adiponectina e suas respectivas curvas de calibração. Os resultados do biossensor baseado em 3-MPA/EDC/NHS/Receptores são mostrados em a), enquanto os relativos aos anticorpos são mostrados em b).

FONTE: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 - Comparação entre os diferentes biossensores desenvolvidos no projeto quanto aos parâmetros envolvidos na detecção do hormônio adiponectina.

Biossensor	Faixa Linear (mol L⁻¹ de adiponectina)	R²	Sensibilidade	Limite de Detecção (nmol L⁻¹ de adiponectina)	Reprodutibilidade (%)
Ab/EIS	0,01 a 1	0,963	$-4,8 \times 10^6 \text{ ohm L}$ $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	5,0	2,08
Receptores/EIS	0,01 a 0,75	0,854	$1,2 \times 10^6 \text{ ohm L}$ $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	7,0	5,63
Ab/CV	0,01 a 1	0,945	$6,3 \times 10^{-5}$ $\text{A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	5,0	28,10
Receptores/CV	0,01 a 0,75	0,992	$-7,6 \times 10^{-5} \text{ A L}$ $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	7,0	1,73

FONTE: Elaborada pelo autor.

Os valores dos parâmetros de detecção são semelhantes aos obtidos com adiponectina de roedores.

Como no caso anterior, todas as construções testadas apresentam o potencial de detectar o hormônio adiponectina dentro de grande parte da faixa de concentrações usualmente encontradas em plasma humano (5,0 a 30 mg mL⁻¹, ou aproximadamente 0,15 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Caso necessário, as amostras de plasma podem ser diluídas para que apresentem concentrações dentro da faixa de respostas linear de cada sensor.

Os valores de sensibilidade obtidos com adiponectina humana dentro das técnicas de EIS e CV são semelhantes entre si e entre os obtidos com adiponectina de roedores. Não foi possível encontrar na literatura sensores semelhantes com valores de sensibilidade descritos. Os coeficientes lineares são, como antes, melhores para a técnica de CV. Outro fato que se destaca é o de que os sensores baseados em anticorpos – tanto para adiponectina de roedores quanto humana – apresentam faixas de resposta linear mais amplas, o que pode ocorrer devido à natureza da ligação entre este e o hormônio. Além disso, a construção testada que apresentou melhores resultados foi a que fez uso dos receptores AdipoR1/R2 e CV. Assim, esta será utilizada para a realização da quantificação do hormônio em amostras reais.

A fim de verificar a máxima concentração de adiponectina capaz de interagir com o dispositivo desenvolvido, realizamos medidas em concentrações de adiponectina superiores à faixa de interesse (acima de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados indicam que a corrente de oxidação do ferricianeto de potássio não se altera significativamente acima de concentrações de aproximadamente $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando, portanto, que este é o ponto de saturação do sensor.

5.5 Amostras Reais de Plasma Humano

Em seguida, foram realizados testes utilizando amostras de plasma humano para verificar o comportamento do biossensor desenvolvido em situação realística.

5.5.1 Teste ELISA

A fim de comparar e confirmar as quantificações de adiponectina em plasma obtidas pelo biossensor desenvolvido, foi realizado o teste padrão ELISA. A partir dos resultados do teste imunoenzimático é possível observar claramente a diferença de concentração média de adiponectina plasmática entre o grupo controle e os diabéticos e obesos (com possível tendência à desenvolver DM 2). A concentração de adiponectina média em plasma por grupo estudado está exposta na

Figura 30. Como esperado, níveis mais baixos do hormônio foram obtidos para os grupos de diabéticos e obesos (média de $0,636$ e $0,577 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente), se comparados com o grupo controle (média de $0,878 \mu\text{mol L}^{-1}$). Sendo assim, a partir do teste ELISA, foi possível segregar com eficiência pacientes com tendência a desenvolver o diabetes dos pacientes controle. Os resultados podem ser vistos individualmente na Tabela 7.

Figura 30 - Estudo da correlação entre a concentração de adiponectina sérica e a condição de saúde dos pacientes. Observa-se claramente que os indivíduos com DM 2 já desenvolvida e os com tendência a desenvolver (obesos) apresentam concentrações inferiores do hormônio analisado.

FONTE: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Descrição detalhada dos resultados obtidos através do teste ELISA para os três grupos de pacientes estudados (controle, diabéticos e obesos).

Grupo	Amostra	Medida	[Adiponectina]($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Média ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Controle	1	1	0,773	0,845
		2	0,916	
	2	1	0,852	0,830
		2	0,809	
	3	1	0,612	0,595
		2	0,577	
	4	1	1,080	1,102
		2	1,124	
Obesos	6	1	0,623	0,571
		2	0,519	
	7	1	0,626	0,611
		2	0,596	
	8	1	0,620	0,623
		2	0,626	
	9	1	0,520	0,502
		2	0,485	
Diabéticos	10	1	0,892	0,919
		2	0,946	
	11	1	0,457	0,620
		2	0,783	
	12	1	0,643	0,628
		2	0,613	
	13	1	0,562	0,568
		2	0,574	
	14	1	0,430	0,445
		2	0,460	

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.5.2 Detecção com Biossensor

O biossensor desenvolvido baseado em CV e nos receptores AdipoR1/R2 foi utilizado para quantificação de adiponectina nas mesmas amostras de plasma. A fim de garantir que as amostras estivessem dentro da faixa linear de resposta do biossensor, estas foram diluídas 1,5x com água Milli-Q. A partir dos valores obtidos pelo método ELISA, uma nova curva de calibração foi traçada – mostrada na Figura 31.

Figura 31 - Curva de calibração do biossensor para o hormônio adiponectina em amostras de plasma humano. a) Voltamogramas cíclicos e b) gráfico de corrente contra concentração de adiponectina.

FONTE: Elaborada pelo autor.

A curva apresentou comportamento semelhante à obtida para as amostras padrão, com um decaimento na corrente do pico de oxidação do ferricianeto de potássio com o aumento da concentração de adiponectina. Apresentou R^2 de 0,976 e sensibilidade de $-2,8 \times 10^{-4} \text{ A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. A corrente-resposta se mostrou mais alta para os mesmos valores de concentração de adiponectina se comparados com valores obtidos para amostra padrão, fenômeno comum devido aos inúmeros interferentes presentes em amostras reais.

A fim de avaliar a influência de interferentes nas medidas, realizou-se o método de adição de padrão. Neste, concentrações crescentes de adiponectina padrão foram adicionadas à amostra real 14 e a resposta do biossensor foi avaliada. A corrente-resposta, então, foi plotada contra a diferença da concentração entre as amostras e a amostra real, gráfico que pode ser observado na Figura 32. Caso não haja atuação de interferentes, a concentração da amostra real deve corresponder ao valor interceptado no eixo x pela curva extrapolada.

Figura 32 - Método de adição de padrão. Amostra de plasma 14.

FONTE: Elaborada pelo autor.

A concentração da amostra 14, quando diluída 1,5x para as medidas, é de $0,297 \mu\text{mol L}^{-1}$. A extrapolação da curva no eixo x leva a um valor de mesma ordem: $0,679 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dessa maneira, concluímos que a interferência de outras substâncias está sendo minimizada pelo sistema desenvolvido. Isso pode ser atribuído principalmente ao fato de que os receptores AdipoR1/R2 são altamente específicos para o hormônio adiponectina e realizam poucas reações cruzadas.

5.5.3 Comparação entre a detecção por ELISA e biossensor

Utilizando a curva de calibração foi possível quantificar o hormônio adiponectina em cada uma das amostras e compará-los com os valores obtidos através do método ELISA. Através do estabelecimento de uma concentração de adiponectina limite ($0,667 \mu\text{mol L}^{-1}$), foi realizada a categorização dos pacientes em diabéticos/com tendência a desenvolver diabetes e o grupo controle. É importante salientar que esta concentração limite foi estabelecida baseada nos resultados

obtidos para este grupo de amostras e não representa um valor universal. A Tabela 8 compara e resume os resultados encontrados.

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos através do método ELISA e pelo Biossensor na quantificação de adiponectina e categorização de pacientes. Pacientes marcados com T-diabético são diabéticos ou tem tendência a desenvolver a doença.

Grupo	Amostra	[Adiponectina] ELISA ($\mu\text{mol L}^{-1}$) /Grupo	[Adiponectina] Biossensor ($\mu\text{mol L}^{-1}$) /Grupo	% Desvio
Controle	1	0,845/Controle	0,690/Controle	-18,29
	2	0,830/Controle	0,809/Controle	-2,52
	3	0,595/T-Diabético	0,596/ T-Diabético	0,31
	4	1,102/Controle	0,730/Controle	-33,74
	5	1,017/Controle	0,750/Controle	-26,25
Obesos	6	0,571/ T-Diabético	0,768/Controle	34,38
	7	0,611/ T-Diabético	0,704/Controle	15,34
	8	0,623/ T-Diabético	0,633/ T-Diabético	1,64
	9	0,502/ T-Diabético	0,545/ T-Diabético	8,46
Diabéticos	10	0,919/Controle	0,455/ T-Diabético	-50,49
	11	0,620/ T-Diabético	0,587/ T-Diabético	-5,25
	12	0,628/ T-Diabético	0,661/ T-Diabético	5,22
	13	0,568/ T-Diabético	0,703/Controle	23,75
	14	0,445/ T-Diabético	0,421/ T-Diabético	-5,31
Taxa de Acertos		85,71%	71,43%	Média: 14,55
Falso Positivo		20,00%	20,00%	
Falso Negativo		11,11%	33,33%	

FONTE: Elaborada pelo autor.

O biossensor desenvolvido foi capaz de separar adequadamente pacientes com potencial tendência a desenvolver diabetes e diabéticos do grupo controle, apresentando uma taxa de acertos semelhante ao método padrão (71,43% e 85,71%, respectivamente). A taxa de acertos relacionada ao biossensor desenvolvido foi menor (diferença de 14,28%) já que o método ELISA é muito bem estabelecido. O desvio entre as concentrações obtidas pelo método padrão e o

método desenvolvido foi baixo, de aproximadamente 14,55%. A taxa de falsos positivos foi de 20,00% para ambos os casos, enquanto a taxa de falsos negativos foi de 11,11% para a técnica ELISA e 33,33% para o biossensor.

Provavelmente as taxas de acerto são limitadas pela separação entre os grupos com potencial tendência a desenvolver diabetes e controle ter sido baseada principalmente no fator obesidade. Considerando que outras características também interferem neste fator – como o tipo de alimentação, raça e sedentarismo – é difícil realizar a separação dos grupos e obter taxas de acerto elevadas. A ausência de valores de adiponectina tabelados na literatura para a caracterização de pacientes também dificulta a separação dos grupos – neste caso, baseamos a categorização pelos resultados obtidos no ELISA. Assim, são necessários mais estudos para a melhor separação entre indivíduos com tendência a desenvolver a doença e controle através da taxa de adiponectina plasmática.

Dessa maneira, apesar do biossensor desenvolvido apresentar taxas de acerto mais baixas se comparado com o método padrão, este foi capaz de categorizar de maneira satisfatória indivíduos com potencial tendência a desenvolver diabetes/diabéticos e controle, com taxas de acerto superiores a 70%. Além disso, o diagnóstico foi realizado de maneira confiável, com rapidez e baixo custo. Acreditamos que o biossensor possua grande potencial para uso em diagnósticos após a realização de estudos mais aprofundados sobre a influência da concentração de adiponectina no desenvolvimento de DM 2.

6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos biossensores nanoestruturados baseados nas técnicas eletroquímicas EIS e CV em conjunto com os bioreceptores AdipoR1 e AdipoR2 ou anticorpos anti-adipoQ para quantificação de adiponectina. Os biossensores foram capazes de gerar resultados de maneira simples, rápida e de baixo custo. Entre as funcionalizações testadas, a relativa à construção ácido 3-MPA/EDC/NHS/Receptores em conjunto com CV apresentou os melhores parâmetros de detecção. O biossensor apresentou ótima linearidade ($R^2=0,992$), na faixa de 0,01 a 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sensibilidade de $-7,6 \times 10^{-5} \text{ A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, além de boa reprodutibilidade. Seu limite de detecção foi calculado em 7,0 nmol L^{-1} . Já para a técnica de EIS, a construção ácido 3-mercaptopropiônico/EDC/NHS/anti-adipoQ apresentou melhor potencial para quantificação do hormônio. Sua resposta apresentou comportamento linear de 0,01 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adiponectina ($R^2=0,963$), com sensibilidade de $-4,8 \times 10^{-6} \text{ ohm L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ e LD 5,0 nmol L^{-1} .

Inicialmente, quantificações de adiponectina envolvendo amostras reais de plasma de origem humana foram executadas pelo teste ELISA. Neste caso, foi possível observar expressiva diferença entre indivíduos saudáveis e obesos (com possibilidade de desenvolver diabetes) ou diabéticos (0,878, 0,577 e 0,636 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Através destes resultados foi determinado o limite de 0,667 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adiponectina para o diagnóstico de pacientes com potencial tendência a desenvolver a doença. Em seguida, as mesmas amostras foram quantificadas através do uso do biossensor desenvolvido. Os resultados foram comparados, então, com os obtidos através do método padrão. Desvios na concentração de adiponectina em cada amostra foram, em média, de 14,55%, um valor relativamente baixo. A acurácia calculada foi de 71,43%, um pouco menor do que o valor obtido com o método ELISA – 85,71%. Apesar disso, o dispositivo apresenta grandes vantagens por apresentar resultados de maneira mais rápida, de baixo custo e portátil.

Esperamos que o desenvolvimento deste biossensor leve à testes de concentração de adiponectina mais acessíveis, contribuindo para o diagnóstico

preditivo de DM 2 em maior número de pacientes e orientação destes em relação às precauções a serem tomadas.

7 PERSPECTIVAS

Implementar o biossensor desenvolvido à um dispositivo real que seja capaz de fornecer o diagnóstico de pacientes com potencial tendência a desenvolver o diabetes de maneira rápida, simples e portátil.

Construir biossensores com aplicações médicas utilizando nanomateriais como grafeno, nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono.

Estudar e propor biossensores simples baseados em técnicas diferenciadas.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**: report of a WHO Consultation. Geneva: WHO, 2000.
- 2 VAN KRUIJSDIJK, R. C. M.; VAN DER WALL, E.; VISSEREN, F. L. J. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 10, p. 2569-2578, 2009.
- 3 KRALISCH, S.; SOMMER, G.; DECKERT, C. M.; LINKE, A.; BLUHER, M.; STUMVOLL, M.; FASSHAUER, M. Adipokines in diabetes and cardiovascular diseases. **Minerva Endocrinologica**, v. 32, n. 3, p. 161-71, 2007.
- 4 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardio-vascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962. doi 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- 5 THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification - (technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.
- 6 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.
- 7 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- 8 JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- 9 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 5 ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2011.
- 10 SMITH, S. M. Strategies for the purification of membrane proteins. **Methods in molecular biology**, v. 681, p. 485-96, 2011. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_29.
- 11 CHAMBERS, J. P.; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L.; WEIS, A.; VALDES, J. J. Biosensor recognition elements. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 10, p. 1-12, 2008.
- 12 MULCHANDANI, A. Enzyme and microbial biosensors. In: MULCHANDANI, A.; ROGERS, K. R. **Principles of enzyme biosensors**. Towota: Humana Press, 1998. p. 3-14.
- 13 FERNANDES, E. G. R.; BRAZACA, L. C.; LUZ RODRIGUEZ-MENDEZ, M.; ANTONIO DE SAJA, J.; ZUCOLOTO, V. Immobilization of lutetium bisphthalocyanine in nanostructured biomimetic sensors using the LbL technique for phenol detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 12, p. 4715-4719, 2011.
- 14 CABAJ, J.; SOLODUCHO, J.; NOWAKOWSKA-OLEKSY, A. Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of phenol derivatives. **Sensors and Actuators B : chemical**, v. 143, n. 2, p. 508-515, 2010.

- 15 PERINOTO, A. C.; MAKI, R. M.; COLHONE, M. C.; SANTOS, F. R.; MIGLIACCIO, V.; DAGHASTANLI, K. R.; STABELI, R. G.; CIANCAGLINI, P.; PAULOVICH, F. V.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTO, V. Biosensors for rapid and efficient diagnosis of Leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9762-68, 2010.
- 16 ZUCOLOTTO, V.; DAGHASTANLI, K. R. P.; HAYASAKA, C. O.; RIUL, A., JR.; CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 2163-2167, 2007.
- 17 ZUCOLOTTO, V.; PINTO, A. P. A.; TUMOLO, T.; MORAES, M. L.; BAPTISTA, M. S.; RIUL, A.; ARAUJO, A. P. U.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1320-1326, 2006.
- 18 PERINOTTO, A. C.; CASELI, L.; HAYASAKA, C. O.; RIUL JUNIOR, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTO, V. Dendrimer-assisted immobilization of alcohol dehydrogenase in nanostructured films for biosensing: ethanol detection using electrical capacitance measurements. **Thin Solid Films**, v. 516, n. 24, p. 9002-9005, 2008.
- 19 MORAES, M. L.; DE SOUZA, N. C.; HAYASAKA, C. O.; FERREIRA, M.; RODRIGUES FILHO, U. P.; RIUL JUNIOR, A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of cholesterol oxidase in LbL films and detection of cholesterol using ac measurements. **Materials Science & Engineering C: biomimetic and supramolecular systems**, v. 29, n. 2, p. 442-447, 2009.
- 20 CASELI, L.; PERINOTTO, A. C.; VIITALA, T.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of alcohol dehydrogenase in phospholipid Langmuir-Blodgett films to detect ethanol. **Langmuir**, v. 25, n. 5, p. 3057-3061, 2009.
- 21 CRESPILO, F. N.; SUMODJO, P. T. A.; ESTEVES, M. C.; PODLAHA, E. J.; ZUCOLOTTO, V. Development of highly selective enzymatic devices based on deposition of permselective membranes on aligned nanowires. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 15, p. 6037-41, 2009.
- 22 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .3. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 831-835, 1992.
- 23 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- 24 DECHER, G. J. D. H. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. **Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie**, v. 95, n. 11, p. 1430-1434, 1991.
- 25 KOTOV, N. A.; DEKANY, I.; FENDLER, J. H. Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte-semiconductor nanoparticle composite films. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 35, p. 13065-13069, 1995.
- 26 MAMEDOV, A. A.; KOTOV, N. A.; PRATO, M.; GULDI, D. M.; WICKSTEDT, J. P.; HIRSCH, A. Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites. **Nature Materials**, v. 1, n. 3, p. 190-194, 2002.

- 27 JIANG, C.; KO, H.; TSUKRUK, V. V. Strain-sensitive raman modes of carbon nanotubes in deflecting freely suspended nanomembranes. **Advanced Materials**, v. 17, n. 17, p. 2127-2131, 2005.
- 28 HE, J. A.; VALLUZZI, R.; YANG, K.; DOLUKHANYAN, T.; SUNG, C.; KUMAR, J.; TRIPATHY, S. K.; SAMUELSON, L.; BALOGH, L.; TOMALIA, D. A. Electrostatic multilayer deposition of a gold-dendrimer nanocomposite. **Chemistry of Materials**, v. 11, n. 11, p. 3268-3274, 1999.
- 29 LVOV, Y.; DECHER, G.; SUKHORUKOV, G. Assembly of thin film by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). **Macromolecules**, v. 26, n. 20, p. 5396-5399, 1993.
- 30 BOULMEDAIS, F.; BALL, V.; SCHWINTE, P.; FRISCH, B.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C. Buildup of exponentially growing multilayer polypeptide films with internal secondary structure. **Langmuir**, v. 19, n. 2, p. 440-445, 2003.
- 31 YOO, P. J.; NAM, K. T.; QI, J.; LEE, S. K.; PARK, J.; BELCHER, A. M.; HAMMOND, P. T. Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces. **Nature Materials**, v. 5, n. 3, p. 234-240, 2006.
- 32 STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Molecular layer processing of polyaniline via the use of hydrogen bonding interactions. **MRS Proceedings**, v. 369, p. 587, 1994. doi: <http://dx.doi.org/10.1557/PROC-369-587>
- 33 SHIMAZAKI, Y.; MITSUISHI, M.; ITO, S.; YAMAMOTO, M. Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charge-transfer interaction. **Langmuir**, v. 13, n. 6, p. 1385-1387, 1997.
- 34 BRYNDA, E.; HOUSKA, M. multiple alternating molecular layers of albumin and heparin on solid surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 183, n. 1, p. 18-25, 1996.
- 35 ANZAI, J. K., Y.; NAKAMURA, N.; NISHIMURA, M.; HOSHI, T. layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s. **Langmuir**, v. 15, n. 1, p. 221-226, 1999.
- 36 LOJOU, E.; BIANCO, P. Buildup of polyelectrolyte-protein multilayer assemblies on gold electrodes. role of the hydrophobic effect. **Langmuir**, v. 20, n. 3, p. 748-755, 2004.
- 37 TANG, Z. Y.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 2006.
- 38 ARIGA, K.; YAMAUCHI, Y.; MORI, T.; HILL, J. P. 25th anniversary article: what can be done with the Langmuir-Blodgett method? Recent developments and its critical role in materials science. **Advanced Materials**, v. 25, n. 45, p. 6477-6512, 2013.
- 39 LI, Y.; NIEHAUS, J. C.; CHEN, Y.; FUCHS, H.; STUDER, A.; GALLA, H. J.; CHI, L. Patterning of proteins into nanostripes on Si-wafer over large areas: a combination of Langmuir-Blodgett patterning and orthogonal surface chemistry. **Soft Matter**, v. 7, n. 3, p. 861-863, 2011.
- 40 PAVINATTO, F. J.; FERNANDES, E. G. R.; ALESSIO, P.; CONSTANTINO, C. J. L.; DE SAJA, J. A.; ZUCOLOTO, V.; APETREI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L., Optimized architecture for tyrosinase-containing Langmuir-Blodgett films to detect pyrogallol. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 4995-5003, 2011.

- 41 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. n.4, 1533-1554, 1996.
- 42 LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, 2005.
- 43 MADOU, M. **Fundamentals of microfabrication**: the science of miniaturization. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.
- 44 MAALOUF, R.; FOURNIER-WIRTH, C.; COSTE, J.; CHEBIB, H.; SAIKALI, Y.; VITTORI, O.; ERRACHID, A.; CLOAREC, J.-P.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 13, p. 4879-4886, 2007.
- 45 JANEGITZ, B. C. **Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro**. 2012. 126f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 46 YANG, M.; TEEUWEN, R. L. M.; GIESBERS, M.; BAGGERMAN, J.; ARAFAT, A.; DE WOLF, F. A.; VAN HEST, J. C. M.; ZUILHOF, H. One-step photochemical attachment of NHS-terminated monolayers onto silicon surfaces and subsequent functionalization. **Langmuir**, v. 24, n. 15, p. 7931-7938, 2008.
- 47 TIMKOVICH, R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 135-143, 1977.
- 48 THERMO SCIENTIFIC. **Amine-reactive crosslinker chemistry**. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/amine-reactive-crosslinker-chemistry>>. Acesso em: 25 de março de 2014.
- 49 THERMO SCIENTIFIC. **Carbodiimide crosslinker chemistry**. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/carbodiimide-crosslinker-chemistry>>. Acesso em : 25 de março de 2014.
- 50 TOMIHATA, K.; IKADA, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 37, n. 2, p. 243-251, 1997.
- 51 TAGUCHI, T.; IKOMA, T.; TANAKA, J. An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 2, p. 330-336, 2002.
- 52 VRANA, N. E.; BUILLES, N.; KOCAK, H.; GULAY, P.; JUSTIN, V.; MALBOUYRES, A.; RUGGIERO, F.; DAMOUR, O.; HASIRCI, V. EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. **Journal of Biomaterials Science : polymer edition**, v. 18, n. 12, p. 1527-1545, 2007.
- 53 BART, J.; TIGGELAAR, R.; YANG, M.; SCHLAUTMANN, S.; ZUILHOF, H.; GARDENIERS, H. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 24, p. 3481-3488, 2009.
- 54 KERMAN, K.; OZKAN, D.; KARA, P.; MERIC, B.; GOODING, J. J.; OZSOZ, M. Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, n. 1, p. 39-47, 2002.

- 55 DHAND, C.; SINGH, S. P.; ARYA, S. K.; DATTA, B.; MALHOTRA, B. D. Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, n. 2, p. 244-251, 2007.
- 56 VAUGHAN, R. D.; O'SULLIVAN, C. K.; GUILBAULT, G. G. Sulfur based self-assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 54-57, 1999.
- 57 GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "curecumin": from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- 58 SHARMA, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 15, p. 1811-1812, 1976.
- 59 SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal antiinflammatory agent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 447-452, 1973.
- 60 JORDAN, W. C.; DREW, C. R. Curcumin - A natural herb with anti-HIV activity. **Journal of the National Medical Association**, v. 88, n. 6, p. 333-333, 1996.
- 61 MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; YUN, G.; LU, Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. **Anticancer Research**, v. 22, n. 6C, p. 4179-4181, 2002.
- 62 ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.
- 63 KUTTAN, R.; BHANUMATHY, P.; NIRMALA, K.; GEORGE, M. C. Potential anticancer activity of tumeric (*curcuma-longa*). **Cancer Letters**, v. 29, n. 2, p. 197-202, 1985.
- 64 KISO, Y.; SUZUKI, Y.; WATANABE, N.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H. Validity of the oriental medicines. Antihepatotoxic principles of *curcuma-longa* rhizomes. **Planta Medica**, v. 49, n. 3, p. 185-187, 1983.
- 65 VENKATESAN, N.; PUNITHAVATHI, D.; ARUMUGAM, V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 231-234, 2000.
- 66 SRIVASTAVA, R.; DIKSHIT, M.; SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N. Anti-thrombotic effect of curcumin. **Thrombosis Research**, v. 40, n. 3, p. 413-417, 1985.
- 67 NIRMALA, C.; PUVANAKRISHNAN, R. Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 85-93, 1996.
- 68 BABU, P. S.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally-induced diabetes in albino-rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 152, n. 1, p. 13-21, 1995.
- 69 DEODHAR, S. D.; SETHI, R.; SRIMAL, R. C. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (*diferuloyl methane*). **Indian Journal of Medical Research**, v. 71, p. 632-634, 1980. PMID7390600.

70 LAO, C. D.; RUFFIN, M. T.; NORMOELLE, D.; HEATH, D. D.; MURRAY, S. I.; BAILEY, J. M.; BOGGS, M. E.; CROWELL, J.; ROCK, C. L.; BRENNER, D. E. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 10, 2006. doi:10.1186/1472-6882-6-10.

71 CHENG, A. L.; HSU, C. H.; LIN, J. K.; HSU, M. M.; HO, Y. F.; SHEN, T. S.; KO, J. Y.; LIN, J. T.; LIN, B. R.; MING-SHIANG, W.; YU, H. S.; JEE, S. H.; CHEN, G. S.; CHEN, T. M.; CHEN, C. A.; LAI, M. K.; PU, Y. S.; PAN, M. H.; WANG, Y. J.; TSAI, C. C.; HSIEH, C. Y. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4B, p. 2895-2900, 2001.

72 KOYUN, A.; AHLATCIOGLU, E.; IPEK, Y. K. Biosensors and their principles. In: KARA, S. **A roadmap of biomedical engineers and milestones**. Rijeka, Croatia: Ed. InTech, 2012. p. 115-142..

73 DIXON B. M., L. J. P., O'NEILL R. D. Characterization in vitro and in vivo of the oxygen dependence of an enzyme/polymer biosensor for monitoring brain glucose. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 119, n. 2, p. 135-142, 2002.

74 KELLY, R. S. **Analytical electrochemistry: the basic concepts**. Disponível em: < http://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Kelly_Potentiometry/EC_CONCEPTS1.HTM >. Acesso em: 18 de dezembro de 2014.

75 GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

76 THÉVENOT D.R.; TOTH K.; DURST R. A.; WILSON G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

77 WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 2043-2081, 2008.

78 GUAN, J. G.; MIAO, Y. Q.; ZHANG, Q. J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219-226, 2004.

79 CHEN, X.; WANG, Y.; ZHOU, J.; YAN, W.; LI, X.; ZHU, J.J. Electrochemical impedance immunosensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 2133-2140, 2008.

80 BARDEA, A.; PATOLSKY, F.; DAGAN, A.; WILLNER, I. Sensing and amplification of oligonucleotide-DNA interactions by means of impedance spectroscopy: a route to a Tay-Sachs sensor. **Chemical Communications**, n. 1, p. 21-22, 1999. doi: 10.1039/A808319C.

81 KHARITONOV, A. B.; ALFONTA, L.; KATZ, E.; WILLNER, I. Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 487, n. 2, p. 133-141, 2000.

82 WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes -estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

83 KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025 - prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.

- 84 INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**. 5th ed. Disponível em: < www.eatlas.idf.org>. Acesso em: 01 de março de 2013.
- 85 SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J.; CARDOSO, M. A. Intervenção nutricional e prevenção primária do diabetes mellitus tipo 2: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 7-18, 2006.
- 86 REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human-disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.
- 87 PORTERO MCLELLAN, K. C.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. Type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and change in lifestyle. **Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.
- 88 WANG, C. C. L.; GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Perspectives in diabetes - molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2735-2740, 2004.
- 89 PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; DE SOUZA, C. T.; SCHENKA, A. A.; ZECCHIN, H. G.; VASSALLO, J.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E.; CARVALHEIRA, J. B. C.; CURI, R.; SAAD, M. J. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1949-1959, 2007.
- 90 GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002.
- 91 ASHCROFT, S. J. H., Protein-phosphorylation and beta-cell function. **Diabetologia**, v. 37, n. 2S, p. S21-S29, 1994.
- 92 FERNANDES, E. G. R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 155f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.
- 93 GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; DE AZEVEDO, M. J. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação de controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.
- 94 US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN RESOURCES. **The surgeon general's call to action to prevent and decrease overweight and obesity overweight and obesity**. Disponível em: <http://www.surgeongeneral.gov/library/calls/obesity/fact_consequences.html>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2013.
- 95 SJOSTROM, L. V. Mortality of severely obese subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 2, p. S516-S523, 1992.
- 96 BLOOMGARDEN, Z. T. Obesity and diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 10, p. 1584-1590, 2000.
- 97 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diabetes programme**. Disponível em: <www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2013.
- 98 AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity**, v. 14, n. 5, p. S242-249, 2006.

- 99 FRUHBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, F. J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 6, p. E827-847, 2001.
- 100 HEMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.
- 101 KOBAYASHI, K.; INOUCHI, T. Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 4, p. 525-529, 2005.
- 102 BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.
- 103 KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.
- 104 SHAPIRO, L.; SCHERER, P. E. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. **Current Biology**, v. 8, n. 6, p. 335-338, 1998.
- 105 FANG, X.; SWEENEY, G. Mechanisms regulating energy metabolism by adiponectin in obesity and diabetes. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, Pt.5, p. 798-801, 2006.
- 106 AFONSO, M. S. S. Adiponectina – uma hormona de futuro. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, s.d. Disponível em: <users.med.up.pt/cc04-10/Adiponectina.doc>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.
- 107 MARQUES-VIDAL, P.; BOCHUD, M.; PACCAUD, F.; MOOSER, V.; WAEBER, G.; VOLLENWEIDER, P., Distribution of plasma levels of adiponectin and leptin in an adult caucasian population. **Clinical Endocrinology**, v. 72, n. 1, p. 38-46, 2010.
- 108 LI, S.; SHIN, H. J.; DING, E. L.; VAN DAM, R. M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes a systematic review and meta-analysis. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 2, p. 179-188, 2009.
- 109 TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772-783, 2006.
- 110 THERMO SCIENTIFIC. **Overview of Elisa**. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#elisaformats>>. Acesso em: 05 de março de 2013.
- 111 BIOVISION. **Adiponectin (human) Elisa Assay Kit**. Disponível em: <<http://www.biovision.com/adiponectin-human-elisa-assay-kit-3720.html>>. Acesso em: 07 de março de 2013.
- 112 ARMBURSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **Clinical Biochemistry Reviews**, v. 29, S1, p. S49-S52, 2008.

- 113 ARMBRUSTER, D. A.; TILLMAN, M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (LOD) limit of quantitation (LOQ) - comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233-1238, 1994.
- 114 LAWSON, G. M. Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing - striving for a consensus. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1218-1219, 1994.
- 115 JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B : chemical**, v. 158, n. 1, p. 411-417, 2011.
- 116 BOSWELL, C. A.; TESAR, D. B.; MUKHYALA, K.; THEIL, F.-P.; FIELDER, P. J.; KHAWLI, L. A. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2153-2163, 2010.
- 117 FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- 118 KIM, B. K.; LI, J.; IM, J.-E.; AHN, K.-S.; PARK, T. S.; CHO, S. I.; KIM, Y.-R.; LEE, W.-Y. Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 671, p. 106-111, 2012. doi:10.1016/j.jelechem.2012.02.022
- 119 GE, C. W.; MIAO, W. J.; JI, M. J.; GU, N. Glutaraldehyde-modified electrode for nonlabeling voltammetric detection of p16(INK4A) gene. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 4, p. 651-659, 2005.
- 120 FUNG, Y. S.; WONG, Y. Y. Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect salmonella in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5302-5309, 2001;
- 121 LI, X.-M.; JU, H.-Q.; DING, C.-F.; ZHANG, S.-S. Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 1, p. 158-163, 2007.
- 122 ABNOVA. **AdipoR1 (human) recombinant protein (P01)**. Disponível em: <http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00051094-P01>. Acesso em: 23 de julho de 2014.
- 123 ABNOVA. **AdipoR2 (human) recombinant protein (P01)**. Disponível em: <http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00079602-P01>. Acesso em: 23 de julho de 2014.
- 124 UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA. **Antibody structure II**. Disponível em: <<http://jeeves.mmg.uci.edu/immunology/CoreNotes/Chap04.pdf>>. Acesso em: 23 de julho de 2014.
- 125 REZAEI, B.; MAJIDI, N.; RAHMANI, H.; KHAYAMIAN, T. Electrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2130-2134, 2011.

126 ELSHAFFEY, R.; TAVARES, A. C.; SIAJ, M.; ZOUROB, M., Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles-protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50 , p. 143-149, 2013. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.063

127 RAGHU, P.; REDDY, T. M.; GOPAL, P.; REDDAIAH, K.; SREEDHAR, N. Y. A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: a voltammetric study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 8-15, 2014. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.002

128 ZHANG, S. X.; WANG, N.; NIU, Y. M.; SUN, C. Q. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 109, n. 2, p. 367-374, 2005.

129 MASHALIDIS, E. H.; BRIGGS, D. B.; ZHOU, M.; VERGARA, A. M.; CHHUN, J. J.; ELLSWORTH, R. K.; GIRON, R. M.; ROOD, J.; BRAY, G. A.; SMITH, S. R.; WYSOCKI, V. H.; TSAO, T.-S. High-resolution identification of human adiponectin oligomers and regulation by pioglitazone in type 2 diabetic patients. **Analytical Biochemistry**, v. 437, n. 2, p. 150-160, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A – Publicações geradas no período de mestrado

A1 Participação em Eventos

-Participação no I Encontro Nacional de Física na Indústria (São Carlos, 2013)

- Participação e apresentação de pôster no Workshop da Rede INEO (Nazaré Paulista, 2013)

Título do Pôster: Development of a nanostructured sensor for phenol detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Edson Giuliani R. Fernandes, Maria Luz Rodríguez-Mendez, Jose Antonio de Saja, Valtencir Zucolotto

-Participação e apresentação de pôster no IV Encontro da Rede Nanobiomed (São Pedro, 2013)

Título do Pôster: Nanostructured Biosensors Containing Transmembrane Receptors for the Detection of Adiponectin Hormone

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Valtencir Zucolotto

-Participação e apresentação de pôster na Terceira Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 3). (São Carlos, Outubro/2013)

Título do pôster: Nanostructured biosensors for the detection of adiponectin hormone and studies of its correlation with diabetes *mellitus* type 2

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Valtencir Zucolotto

-Participação na XXIV Escola de Verão em Química organizada pela UFSCAR (São Carlos, 2014)

-Participação e apresentação oral na Quarta Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 4). (São Carlos, Outubro/2014)

Título da apresentação: Biossensores Nanoestruturados Para Detecção do Hormônio Adiponectina e Investigação de sua Correlação com Diabetes *Mellitus* Tipo 2

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Valtencir Zucolotto

-Apresentação de pôster na Quarta Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 4). (São Carlos, Outubro/2014)

Título da apresentação: Biosensor development for hormone melatonin detection

Autores: Camila Barbosa Bramorski, Laís Canniatti Brazaca, Regina Pekelmann Markus, Valtencir Zucolotto.

-Apresentação de pôster na Quarta Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 4). (São Carlos, Outubro/2014)

Título da apresentação: A new detection approach for the chronic kidney disease in initial stages using synthetic biology

Autores: Danilo Zampronio, Raissa Gutierrez, Ana Paula Ulian de Araújo, Francis Nunes, André Maizel, Brenda Moreira, Bruno Ono, Camila Bramorski, Clélio Santos Jr., Danilo Vieira, Fernando Lindenberg, Fernando Tanouye, Guilherme Kundlatsch, Ivan Rosa e Silva, Jonathan Moraes, Laís Brazaca, Laís Ribovski, Luciano Zane Filho, Mariana Trevisan, Matheus Gonçalves, Monique Gasparoto Freitas, Otto Heringer, Pedro Pessoa, Pedro Medeiros, Rita Wu, Theresa Jesus, Victor Nogueira, Cléslei Zanelli, Valtencir Zucolotto

-Participação e apresentação de pôster no MRS Fall Meeting and Exhibit (Boston, Novembro/2014)

Título do pôster: Development of an electrochemical biosensor for adiponectin detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino Bernardi, Valtencir Zucolotto

A2 Matérias Encaminhadas Para Publicação

- Depósito de Patente em andamento: Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino Bernardi, Valtencir Zucolotto. **Dispositivo biossensor para a detecção do hormônio adiponectina. 2014.**

-Pedido de depósito de patente sendo redigido: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino Bernardi, Valtencir Zucolotto. **Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para a Detecção do Hormônio Melatonina. 2014.**

-Pedido de depósito de patente sendo redigido: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. **Genossensor para a detecção de traços genéticos de anemia falciforme. 2014.**

-Artigo sendo redigido: Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino Bernardi, Valtencir Zucolotto. **Development of an Electrochemical Biosensor for Diabetes Type 2 Early Diagnosis by Adiponectin Quantification. 2014.** Aguardando depósito de patente.

-Artigo sendo redigido: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino Bernardi, Valtencir Zucolotto. **Electrochemical based biosensors for Melatonin Detection and Quantification. 2014.** Aguardando depósito de patente.

-Artigo sendo redigido: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. **Development of a genosensor to detect Sickle-cell anaemia genetic traces. 2014.** Aguardando depósito de patente.

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética

Belo Horizonte, 24 de junho de 2004

Ilmo Sr.
Dr. Raimundo Marques do Nascimento Neto
Coordenador Geral do Projeto Corações do Brasil

Ref. "Projeto Corações do Brasil" Estudo Epidemiológico dos Fatores de Risco das Doenças Cardiovasculares.

Prezado Doutor,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Hipertensão Arterial de Minas Gerais, analisou o projeto "Corações do Brasil" Estudo Epidemiológico dos fatores de Risco das Doenças Cardiovasculares, juntamente com o questionário a ser aplicado aos voluntários que participarão da pesquisa. Nada foi constatado que contrariasse os aspectos éticos, culturais e morais dos prováveis voluntários que participarão da pesquisa. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Hipertensão, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Cordialmente,

Gilberto de Almeida Fonseca Filho
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto de Hipertensão Arterial e MG