UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
GUSTAVO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE *HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA* UTILIZANDO BIOCHAR COMO PLATAFORMA DE ANCORAMENTO

CURITIBA
2018

GUSTAVO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE *HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA* UTILIZANDO BIOCHAR COMO PLATAFORMA DE ANCORAMENTO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr.

Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio F. Bergamini

CURITIBA

2018

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Martins, Gustavo
Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Hantavírus Araucária utilizando biochar como plataforma de ancoramento / Gustavo Martins. – Curitiba, 2018.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

1. Biomassa. 2. Hantavirus. 3. Eletroquímica (Imunossensor). I. Marcolino Jr., Luiz Humberto. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Exatas
Departamento de Química
Coordenação de Pós-Graduação

Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que **Gustavo Martins** fez Defesa Pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada **"Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Hantavírus araucária utilizando biochar como plataforma de ancoramento"**, em 22 de março de 2018. O trabalho foi avaliado por uma banca examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr. (DQ/UFPR)
Prof.ª Dr.ª Christiana Andrade Pessôa (DQ/UEPG)
Prof.ª Dr.ª Andrea Pinto de Oliveira (DQ/UFPR)

Após a avaliação, o aluno foi considerado **aprovado**.

Informamos ainda que o referido aluno obteve aprovação em todas as disciplinas cursadas no Mestrado e está, no momento, aguardando os trâmites legais para a obtenção de seu diploma de Mestre em Química.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração,

Curitiba, 22 de março de 2018.

Jaísa Soares

Jaísa Fernandes Soares
Coordenadora

Ao meu irmão, pelos anos
de apoio e incentivo.

Aos meus pais.

por me ensinar a acreditar,

pelo amor e paciência

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Jr., pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo incentivo, por acreditar e confiar uma pesquisa pioneira em seu laboratório de pesquisa, mas acima de tudo pela grande amizade gerada nos anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini, pela co-orientação, pelo conhecimento compartilhado, afinal só a luta muda a vida, pelos cafés e conversas e pela amizade.

Às professoras Drª. Andreia e Marcella, pelas contribuições na pesquisa durante o exame de qualificação. Aos membros dessa banca, novamente Profª. Drª. Andreia e Profª. Drª. Christiana.

À CAPES e CNPq pela bolsa.

À UFPR pela estrutura cedida.

Aos colegas do LabSensE, pelo carinho, amor e apoio. Levo daqui amizades pra vida, nada seria possível sem a ajuda de vocês.

Em especial ao meu irmão Thiago Martins, que teve papel fundamental desde o ingresso na graduação. Você tornou tudo isso possível, meu espelho de pessoa e caráter, agradeço a pessoa que sou hoje à você. Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, que tudo seria possível, não queria que nada fosse diferente. Amo vocês!

Agradeço aos também aos não mencionados, mas que de alguma maneira contribuíram, seja cientificamente, moralmente, ou só uma cerveja no bar.

Obrigado.

Wish we could turn back time
To the good old days
When our momma sang us to sleep
But now we're stressed out
(Twenty One Pilots)

RESUMO

Hantavirus são agentes etiológicos transmitidosprincipalmente por roedores silvestres. Dentre as suas patologias, a síndrome pulmonar por Hantavírus (SPH) surge nas Américas, causada por Hantavirus Araucária e atinge 40% de letalidade. O diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos IgG específicos contra o agente patogênico.Aqui, é proposto um imunossensor eletroquímico baseado em um material carbonáceo altamente funcionalizado (biochar), que é obtido através da pirólise de biomassa. Este material foi utilizado para modificação de eletrodos de pasta de carbono, para ancoramento danucleoproteina do Hantavirus (dispositivo denominado EPCMB – Ag) e anticorpo contra Hantavirus (dispositivo denominado EPCMB – Ab), visando dois ensaios rápidos:utilizando EPCB – Ab: detecçãoda nucleoproteína de hantavírus (Ag), que possibilita detecção da doença durante estágio viremico; utilizando EPCMB – Ag: detecção dos anticorpos IgG contra o hantavirus (Ab), que possibilita diagnostico durante periodo sintomático. Os resultados apresentaram uma sensibilidade para detecção do Ag, com o dispositivo EPCMB – AB, de 5,28 μA dec^{-1},com concentrações de Ag variando de 5,0ng mL^{-1} a 1,0 μg mL^{-1}. A detecção de Ab, utilizando dispositivo EPCMB – Ag, funciona como sensor de tipo qualitativo acima de 200 ng mL^{-1}. Ambos os sensores foram avaliados sua seletividade e amostras de soro; seletividade contra a doença de Gumboro, proteína VP2 e anticorpo IgG2a contra Febre Amarela (FA), respectivamente. Assim, os dispositivos aqui propostos são ferramentas promissoras adequadas para pesquisas clínicas de roedores e hantavírus humanos.

Palavras-chave: *Hantavirus Araucaria*, biochar, imunossensores, teste rápido.

ABSTRACT

Hantavirus are etiologic agents mainly transmitted by wild rodents. Among its pathologies Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) arises at Americas, caused by *Hantavirus Araucária* and reaches 40% lethality. The diagnostic is based on the presence of specific IgG antibodies. Herein, is proposed an electrochemical immunosensor based on highly functionalized carbonaceous support (biochar), which is obtained through biomass pyrolisis and is a carbon rich material. This material was utilized to modify carbon paste electrodes, to anchor hantavirus nucleoprotein (device called EPCMB – Ag) or IgG antibody against Hantavirus (device called EPCMB – Ab) aiming rapid tests: EPCB – Ab: hantavirus nucleoprotein (Ag) detection, that indicates a viremic stage of the pathology; EPCMB – Ag detection of the IgG antibodies (Ab) against hantavirus, that indicates the pathology during symptomatic period. The results presented a device sensibility of 5.28 μA dec^{-1} to the Ag detection, ranging from 5.0ng mL^{-1} to 1.0 μg mL^{-1}, the Ab detection works as qualitative type sensor above 200 ng mL^{-1}. Both sensors were evaluated its selectivity and serum samples; selectivity against Gumboro disease, VP2 protein, and antibody IgG2a against Yellow fever disease (YF), respectively. So, the devices here proposed are promising tool suitable for both rodent and human hantavirus clinical surveys.

Keywords: Hantavirus; Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS); electrochemical immunosensor; biochar; rapid test;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS PRODUZIDOS: IgG E IgM. 18
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO (IgG). 19
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO HANTAVIRUS. 21
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DE INFECÇÃO VIRAL. 23
FIGURA 5: DIAGRAMA DE ENSAIOS ELISA MAIS COMUNS 24
FIGURA 6: DIAGRAMA DE ENSAIOS ELISA MAIS COMUNS 25
FIGURA 7: ESQUEMA DE DIVISÃO DOS BIOSENSORES. 26
FIGURA 8: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR INDIRETO, OU BIOMARCADO. 29
FIGURA 9: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR DIRETO, OU LABEL-FREE. 29
FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BIOCHAR. 34
FIGURA 11: ESQUEMA DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO. 35
FIGURA 12: PROCESSO DE LIGAÇÃO COVALENTE POR SUBSTITUIÇÃO. 39
FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DO EPCM. 43
FIGURA 14: ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO PROCESSO ANCORAMENTO DAS PROTEINAS. 44
FIGURA 15: (A) IMAGENS MEV DO BIOCHAR APÓS TRATAMENTO ÁCIDO COM AUMENTO DE 300 VEZES; (B) IMAGENS MEV DO BIOCHAR COM AUMENTO DE 300 VEZES. 48
FIGURA 16: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA O BIOCHAR E BIOCHAR TRATADO. 50
FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO DO BIOCHAR 51
FIGURA 18: MECANISMO DE REAÇÃO DO EDC-NHS 52
FIGURA 19: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA O BIOCHAR TRATADO E BIOCHAR ATIVADO COM EDC+NHS. 53
FIGURA 20: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM

BIOCHAR TRATADOUTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} EM pH 3,0. 54
FIGURA 21: ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE CONTRUÇÃO E TRANSDUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. 55
FIGURA 22: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR. 57
FIGURA 23: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM BIOCHAR TRATADO UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO3 0,1 mol L^{-1} EM pH 3,0. 58
FIGURA 24: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR. 59
FIGURA 25: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CICLOS CONSECUTIVOS DO EPC APÓS PROCESSO DE ANCORAMENTO – ANTICORPO E BSA (B) GRAFICOS DE BARRA CONSTRUIDOS PARA DIFERENTES CICLOS VOLTAMÉTRICOS. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV. 60
FIGURA 26: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO DE LEITURA. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} 61
FIGURA 27: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ANCORAMENTO DA ALBUMINA. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0. 63
FIGURA 28: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM BIOCHAR E OS AGENTES ATIVADORES. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0. 64
FIGURA 29: (A) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUIDOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $K_3[Fe(CN)_6]$. (B) GRÁFICO DE

BARRAS DE RELAÇÃO PORCENTAGEMDO BRANCO (100%) E VARIAÇÃO DA SONDA..... 65
FIGURA 30: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES QUANTIDADES DE ANTICORPO ANCORADO NA SUPERFÍCIE, E (B) CORRENTES DE PICO ANÓDIO; EM $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0, 50mV s^{-1}..... 67
FIGURA 31: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIGENO. (B) CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE CONCENTRAÇÃO ADICIONADA E INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0, (n = 3)..... 68
FIGURA 32: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPO. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0,..... 70
FIGURA 33: GRÁFICOS DE BARRA DE AVALIAÇÃO DO INTERFERENTE. 71
FIGURA 34: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO E SORO FORTIFICADO COM ANTIGENO (AG) (B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO E SORO FORTIFICADO COM ANTICORPO (AB). UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0,..... 72
FIGURA 35: APLICABILIDADE DO SENSOR QUALITATIVO..... 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês Desoxyribonucleic acid)
RNA - Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)
IgM - Imunoglobulina M
IgG - Imunoglobulina G
FHSR - Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
SPH - Síndrome Pulmonar por Hantavírus
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática(do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
HRP -*Horseradish peroxidase*
SAM - Monocamada auto-organizável (do inglês Self-assembled Monolayer)
EDC - Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida
NHS - N-Hidroxisuccinimida
BSA - Albumina de soro bovino (do inglês Bovine serum albumin)
EIS - Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês electrochemical impedance spectroscopy)
MCQ - Microbalança de cristal de quartzo (do inglês Quartz crystal microbalance)
Ag - Nucleoproteína do Hantavírus *Araucaria*
Ab - Anticorpo específico para Hantavírus *Araucaria*
EPC - Eletrodo de pasta de carbono
EPCM - Eletrodo de pasta de carbono modificado
EPCMB - Eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar
EPCMB – Ab - Eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar e anticorpo ancorado
EPCMB - Ag - Eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar e nucleoproteína de hantavírus ancorada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 VÍRUS, SISTEMA IMUNE, HANTAVÍRUS E DIAGNÓSTICO. 17
1.2 BIOSSENSORES 25
1.2.1 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS 26
1.2.2 GENOSSENSORES 27
1.2.3 BIOSSENSORES CELULARES 27
1.2.4 SENSORES BIOMIMÉTICOS 28
1.2.5 IMUNOSSENSORES 28
1.3 MÉTODO PIEZOELÉTRICO 30
1.4 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA 31
1.5 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS 31
1.6 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS 35
2 OBJETIVOS 41
3 MATERIAIS E MÉTODOS 42
3.1 PREPARAÇÃO DO BIOCHAR 42
3.2 CONSTRUÇÃO DO EPC COM BIOCHAR 42
3.3 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR 43
3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS 45
3.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) 45
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 45
3.7 TITULAÇÃO BASEADA NO MÉTODO BOEHM 45
3.8 MÉTODO B.E.T. 46
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 47
4.1 PREPARAÇÃO E ATIVAÇÃO DO BIOCHAR 47
4.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS 47
4.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR). ... 49
4.4 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE ANALÍTICA DO DISPOSITIVO.... 51
4.5 CARACTERIZAÇÕES E OTIMIZAÇÕES VOLTAMÉTRICAS 61
4.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA 68
4.7 APLICAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES EM AMOSTRA REAL 72

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 75
6 ETAPAS FUTURAS 76
7 REFERÊNCIAS 77

1 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS, SISTEMA IMUNE, HANTAVÍRUS E DIAGNÓSTICO.

Os Vírus são agentes infecciosos de dimensões nanométricas que apresentam em sua estrutura essencialmente ácidos nucléicos, sejam estes DNA ou RNA de fita dupla ou simples. A estrutura genética viral costumeiramente apresenta-se em um invólucro de proteína chamada nucleoproteína que protege o material genético. A estrutura viral é simples, ao ser comparado com células por exemplo, e não são considerados organismos uma vez que não apresentam organelas, característica que confere ao vírus defasagem de potencial bioquímico, ou seja, ausência de enzimas, fundamental nos processos metabólicos. Sendo assim, dependem de estruturas celulares para processos de replicação, os tornando parasitas intracelulares obrigatórios [1,2].

O vírus se utiliza do material biológico do hospedeiro para se reproduzir [3]. Por esse motivo mutações acontecem de forma não espontânea e não relacionados à um processo adaptativo, as mutações são essencialmente influenciadas pelo material genético e composição celular do hospedeiro, e afetam tanto o material genético do vírus quanto os chamados sítios antigênicos, que são partes específicas do vírus que causam uma reação do sistema imune do hospedeiro, também chamados de epitopo [4].

Após o processo de infecção, o primeiro estágio viral é a viremia, a qual consiste na presença do vírus circulando na corrente sanguínea e tem como principal função o processo de alastramento e alocação do vírus no organismo[5]. Em contraposto, o corpo humano apresenta como resposta a imunidade contra infecções virais, a qual depende da atuação integrada da imunidade inata e adquirida[6]. Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata atuam imediatamente após o contato com o hospedeiro com as partículas virais, entretanto não possuem habilidade de discriminação entre diferentes estruturas virais, sendo assim são inespecíficos e não apresentam resposta memorial[6]. A resposta inata, responsável pela primeira defesa do organismo, é constituída essencialmente de enzimas, peptídeos antivirais e anticorpos IgM (inespecíficos), apresentam também a função de reconhecimento das estruturas antigênicas,

denominadas epitopos, para produção e liberação de uma resposta lenta mas específica e memorial denominada imunidade adquirida, a qual é constituída inicialmente de anticorpos IgG específicos[6].

Como os sítios antigênicos podem ser diferentes entre si, alguns anticorpos específicos são criados, porém, os sítios podem sofrer mutações junto com o material genético, e os IgG criados em uma contaminação anterior reagem parcialmente ao antígeno, ocorrendo a reincidência da doença, como no caso do vírus influenza da gripe comum. [3] Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** é a presentada uma ilustração das estruturas dos anticorpos IgM e IgG.

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS PRODUZIDOS: IgG E IgM.

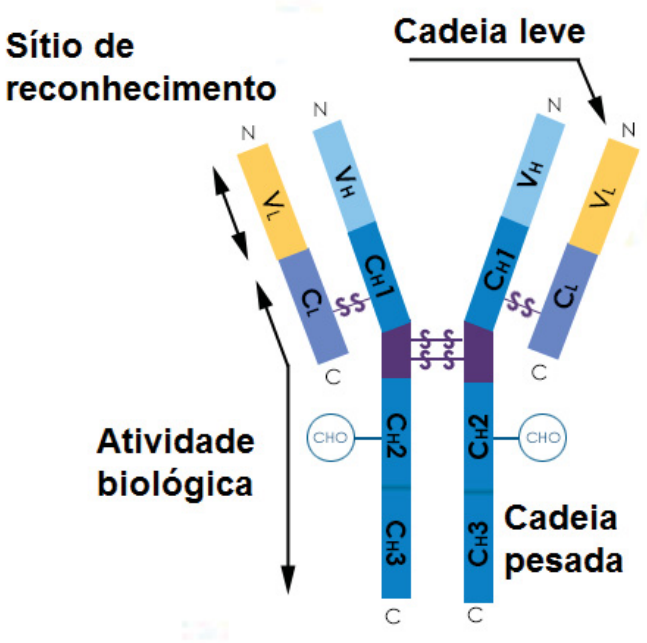
FONTE: http://www.abcam.com/protocols/antibody-structure-and-isotypes

Inicialmente a liberação de anticorpos IgM (inespecíficos) consiste na produção de anticorpos policlonais, os quais são anticorpos derivados de diferentes linhagens de linfócito B, que são células responsáveis pela produção de anticorpos contra antígenos[6]. Sendo assim, eles são uma mistura de imunoglobulinas (anticorpos – Ig) secretadas, cada uma responsável pelo reconhecimento de um epitopo diferente (estrutura de reconhecimento antigênico). A existência de diferentes anticorpos, em uma única estrutura, para um mesmo agente patogênico torna a resposta pouco eficiente, no quesito combate ao vírus, entretanto possibilita um reconhecimento rápido para ativação da resposta adquirida (resposta específica)[6].

Após a ativação da resposta adquirida, a liberação de anticorpos IgG específicos é feita a partir de reprodução monoclonal. Anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de um linfócito B, esses anticorpos apresentam-se iguais entre si em estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, afinidade e especificidade, ligando-se sempre ao mesmo epitopo no antígeno, garantindo resposta eficiente e específica contra o vírus[7].

Apesar da possibilidade de diferentes tipos de anticorpos, a estrutura geral de um anticorpo é constante, sendo esta composta por duas cadeias carbônicas, levee pesada, variáveis, e uma bicadeia pesada invariável. As cadeias carbônicas superiores, leve (V_L) e pesada (V_H) são a porção variável do anticorpo, esta possui função de reconhecimento e interação com antígenos, sendo a região de ligação antígeno-anticorpo (sítio de reconhecimento) uma porção hipervariável, a qual confere especificidade de ligação com um sítio do antígeno. Já a bicadeia, oucadeia pesada, interage com os receptores da superfície de células ou proteínas; esta propriedade permite aos anticorpos ativar o sistema imunológico[3,7]. Na FIGURA 2está ilustrada a estrutura característica de um anticorpo.

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO (IgG).



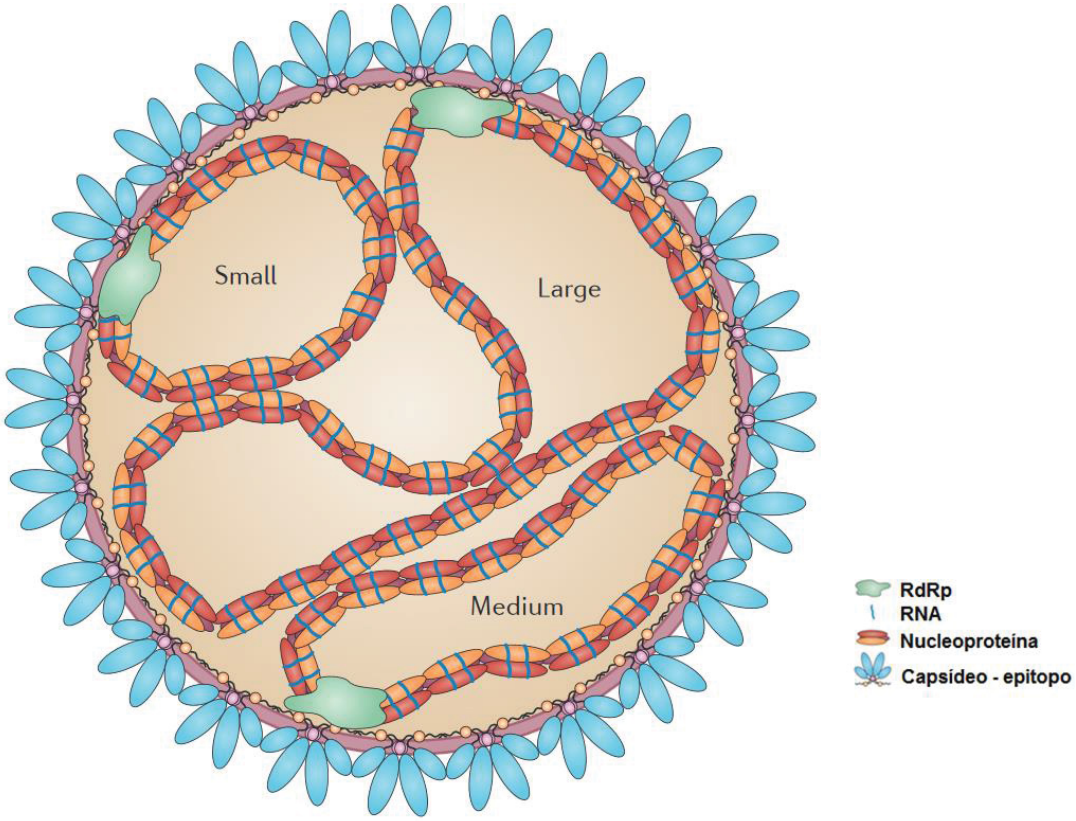
FONTE: Adaptado de http://www.abcam.com/protocols/antibody-structure-and-isotypes

Hantavírus é classificado como um gênero viral, pertencente à família *Bunyaviridae*, que agrupa diversos vírus de estrutura genética RNA. Apesar da diversidade, a estrutura viral se assemelha para todos: envelopados esfericamente, diâmetro de aproximadamente 100nm, apresentam RNA viral de fita simples (fita única), o qual é trissegmentado, com polaridade negativa[8]. Os segmentos de RNA são denominados:

- L (large – grande): codifica a transcriptase viral, enzima que tem como função transformar RNA de polaridade negativa, que não pode ser lido, em RNA de polaridade positiva, também chamado de mRNA. O RNA de polaridade positiva pode ser facilmente traduzido pelo ribossomo celular, que então produz as proteínas codificadas no material genético[9];
- M (médium – médio): é o RNA que codifica as glicoproteínas do capsídeo, que são um conjunto de proteínas que formam o epitopo e protegem o material genético. O epitopo é uma porção de antígeno possível de gerar a resposta imune. É uma região da estrutura do antígeno que se liga aos receptores celulares, para adentrar o meio intracelular, e aos anticorpos[9];
- S (small – pequeno): responsável pela codificação da nucleopreoteína viral. Atua no processo de alocação e proteção mecânica do material genético viral. Estrutura similar ao epitopo, podendo ativar o sistema imune[9].

A estrutura do Hantavirus está representada na FIGURA 3.

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO HANTAVIRUS.



FONTE: Adaptado de Antti Vaheri [10]

Os vetores do hantavírus são essencialmente roedores silvestres. Não há registro de casos de vetores urbanos ou domésticos. Dentre os modos de transmissão mais comuns, lista-se de forma decrescente em ocorrência:

- Inalação de partículas virais aerossolizadas (transportadas pelo ar), proveniente de excrementos ou saliva de roedores;
- Contato com mucosas ou feridas infectadas, inclusive entre humanos;
- Ingestão de água ou alimentos contaminados[10].

Devido aos processos de mutação do vírus, existem diversas variações do vírus, que se relaciona diretamente à espécie infectada e a região e como consequência a patologia desenvolvida. A presença no corpo humano pode levar à Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), normalmente diagnosticada na região Eurásia, ou Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), mais frequente nas Américas. [8]

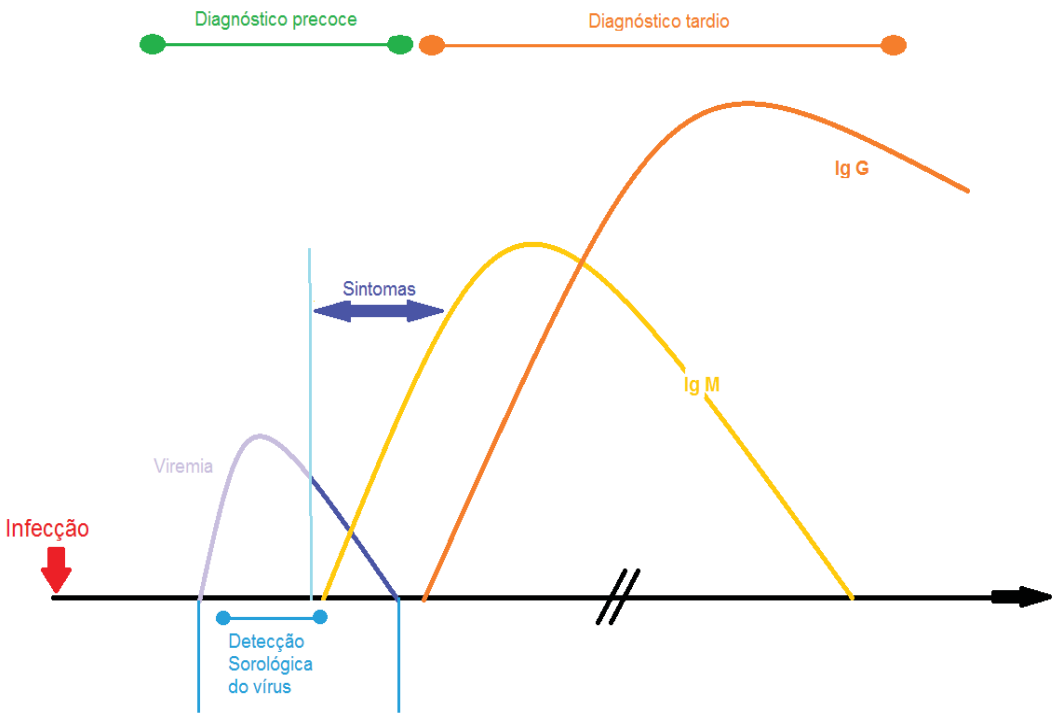
Apesar da FHSR essencialmente asiática, de onde seorigina a descoberta e a nomenclatura viral - rio Hanta, Coréia do Sul, o primeiro caso epidêmico ocorreu durante a guerra da Coréia (1951 – 1954), quando aproximadamente 3000 combatentes estadunidenses contraíram o vírus. Atualmente a FHSR apresenta taxa de mortalidade de até 10% dos casos de infecção, taxa relativamente baixa, quando comparado à SPH, que chega a 50%[11]. Devido a possibilidade de tratamento da FHSR por hemodiálise e Ribavirina (medicamento antiviral).

A SPH pode ser encontrada da Argentina ao Canadá, e até o momento foi confirmada em 15 estados do Brasil. As contaminações ocorrem em cidades rurais. Desde 2004 ocorrem cerca de 120 infecções por ano no Brasil, com uma letalidade média de 50% dos casos, devido a falta de tratamento específico [12,13]. No estado do Paraná a variação do vírus responsável pelas contaminações é denominada Hantavírus *Araucaria* [14].

Os sintomas iniciais consistem em dores musculares, de cabeça, febre e tosse. Estágios posteriores incluem danos ao sistema respiratório, sendo que o desenvolvimento total da SPH ocorre de 2 a 7 dias após os primeiros sintomas, comprometendo os capilares pulmonares, e a partir disso é reportado insuficiência respiratória seguida de choque cardiogênico.As semelhanças clínicas encontradas na SPH e outras infecções virais tornamo diagnóstico da doençapor exames clínicos difícil, portanto, diagnósticos moleculares e serológicos se fazem necessários para a correta identificação do agente patogênico e tratamento adequado[15].

A infecção em humanos resulta em viremia de curto prazo ea resposta imune do organismo libera anticorpos IgM e IgG contra o antígeno, sendo a detecção destes anticorpos o que o permite diagnóstico do agente patogênico no início dos sintomas clínicos. Agentes patogênicos virais apresentam reprodução intracelular obrigatória durante a etapa sintomática, consequentemente inviabilizam a detecção direta do vírus, por outro lado a detecção da proteína nucleocapsídica do vírus (nucleoproteína), durante a etapa viremica (prévio aos sintomas), permite o diagnóstico em estágios iniciais da doença, assintomáticos, como mostrado na Figura 4[15].

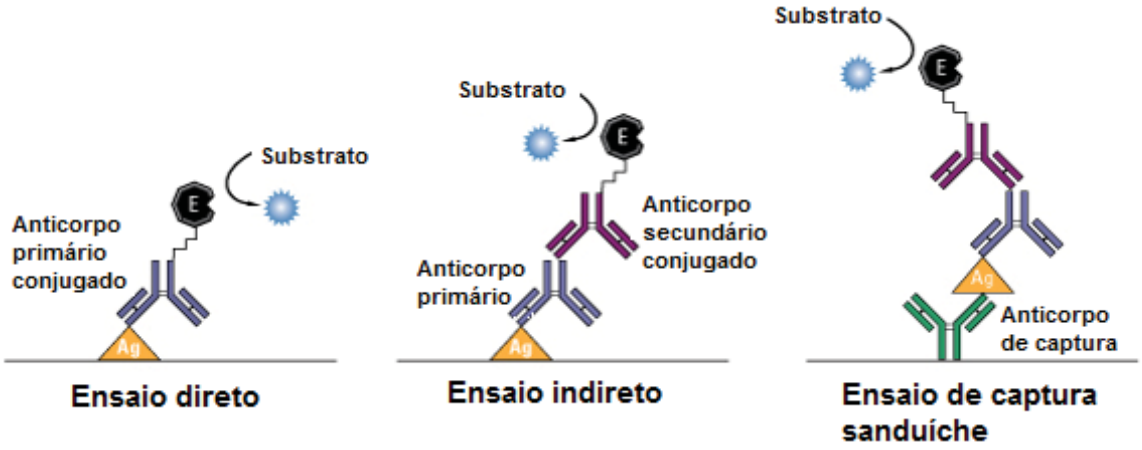
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DE INFECÇÃO VIRAL.



FONTE: O autor.

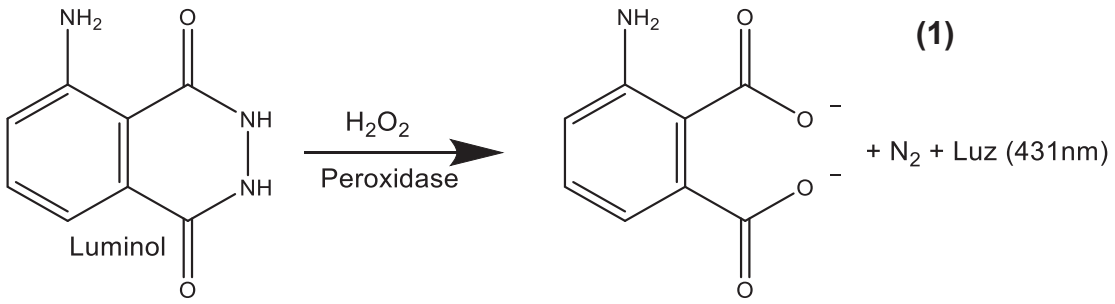
O processo de diagnóstico (detecção dos anticorpos IgM ou IgG e proteína nucleocapsídica viral) usual é via método ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay),* o qual consiste em uma abordagem óptica. Neste caso um marcador enzimático conjugado a um anticorpo, reconhecedor do agente patogênico em questão, produz um sinal em contato com o substrato, como exemplificado na FIGURA5. As enzimas, utilizadas como marcadores mais comuns nestes ensaios são a Horseradish Peroxidase(HRP) e a Fosfatase Alcalina(AP)[16].

FIGURA 5: DIAGRAMA DE ENSAIOS ELISA MAIS COMUNS



FONTE: Adaptado de http://www.neolomed.com/Elisa_assay.html

A peroxidase é uma enzima que reduz seletivamente H_2O_2, o produto da reação redox reage com um substrato cromóforo, o qual se oxida e emite um sinal ótico mensurável. Dentre os possíveis substratos, o mais utilizado é o luminol, sendo principalmente aplicado em estudos de imunocitoquímica. A oxidação deste substrato com H_2O_2é uma reação quimioluminescente, sendo assim, emite luz com comprimento de onda de 431 nm em condição aquosa, de acordo com a Reação 1. Neste caso,a luz emitida pode ser mensurada por espectroscopia UV/Vis[17].



A AP, por sua vez, é uma enzima que hidrolisa ligações com o grupo fosfato. Desta forma, os cromóforos são compostos que possuem grupos fosfato, e que com a sua perda adquirem cor, como é o caso do p-Nitrofenil-fosfato, que se torna amarelo ao hidrolisar.Talreação também podem ser monitoradas por espectroscopia UV/Vis em aproximadamente 410 nm[17].

O elevado índice de seletividade, sensibilidade e a possibilidade de análises multianalitos tornaram os ensaios ELISA uma técnica muito popular para detecção de agentes patogênicos. Entretanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens experimentais, como grande tempo de análise (maior que 6 horas),

devido às etapas de incubação, além da dificuldade de quantificação. Ainda, como se trata de uma detecção óptica, há risco de se obterem falsos positivos em casos de amostras que formam complexos coloridos[18].

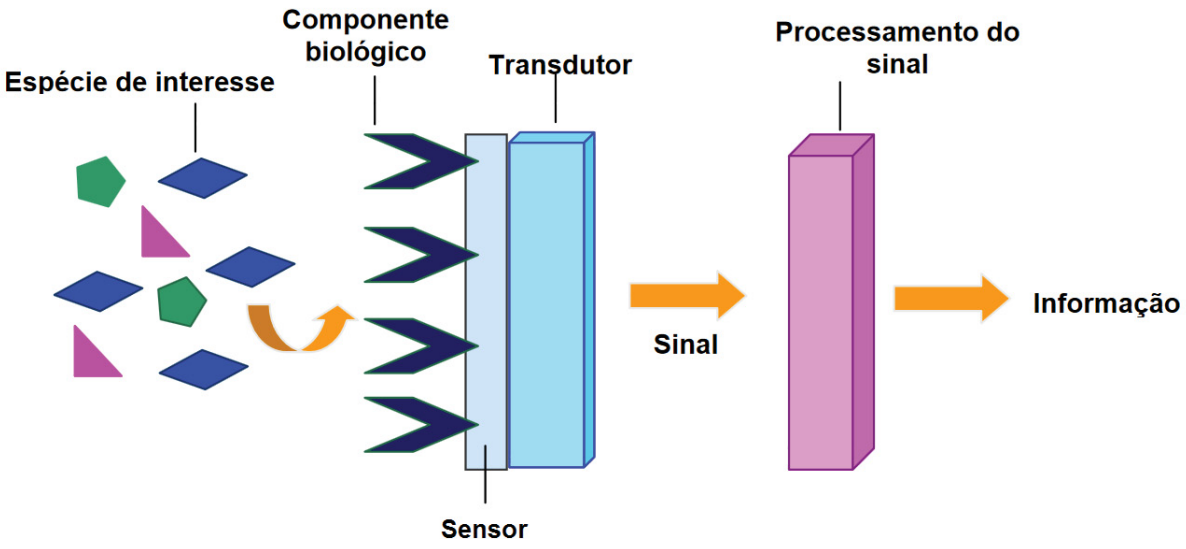
1.2 BIOSSENSORES

Os biossensores são definidos como dispositivos capazes de converter um sinal bioquímico em um sinal mensurável. Essencialmente sua estrutura é constituída de três componentes:

- O elemento de reconhecimento biológico, o qual interage e identifica estímulos, sejam estes biológicos ou bioquímicos;
- O transdutor, o qual converte o estimulo em um sinal mensurável;
- O sistema de processamento do sinal, que amplifica e exibe os dados em formato apropriado[19].

O sistema básico de um biossensor está representado na FIGURA 6.

FIGURA 6: DIAGRAMA DE ENSAIOS ELISA MAIS COMUNS

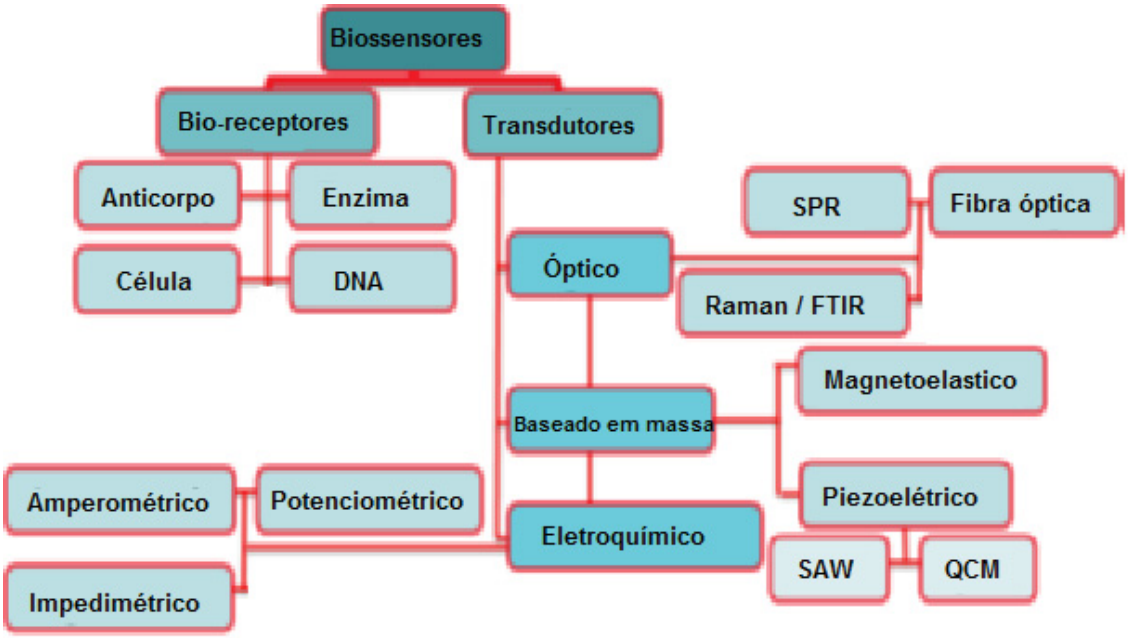


FONTE: Adaptado de http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=tema.97

Dentre as aplicações de biossensores destaca-se o diagnóstico de doenças, segurança e verificação alimentar e monitoramento ambiental.

A importância no desenvolvimento debiossensores é sustentada principalmente pela sua elevada seletividade, o que permite detecção de um amplo espectro de analitos em amostras complexas. Biossensores, então, podem ser classificados de acordo com o elemento biológico utilizado e o transdutor, como esquematizado na FIGURA 7[20].

FIGURA 7: ESQUEMA DE DIVISÃO DOS BIOSENSORES.



FONTE: Adaptado de G. Zhao e col.[21].

Dentre os possíveis elementos reconhecedores biológicos os de ampla utilização são: enzimas, anticorpos, antígenos, organelas, células e tecidos. A escolha do elemento de reconhecimento leva em consideração a seletividade e a sensibilidade para o analito alvo, ou seja, a afinidade entre as estruturas biológicas. Sendo assim, os biossensores podem ser classificados, de acordo com o elemento reconhecedor, em: imunossensores, biossensores enzimáticos, genossensores, biossensores celulares e sensores biomiméticos.

1.2.1 Biossensores enzimáticos

As enzimas são grupos de substâncias, geralmente de origem protéica, que catalisam reações químicas e bioquímicas. Enzimas podem ser utilizadas como elemento reconhecedor, a fim de promover reações enzimáticas em um substrato,

o dispositivo denomina-se biossensor enzimático. Dentre as vantagens deste dispositivo destaca-se a seletividade enzimática, ainda estes dispositivos apresentam uma vasta gama de possibilidades de analitos e enzimas, para diversos fins, aliado ao baixo tempo de resposta [19].

Dentre os métodos de detecção, utilizados em sensores enzimáticos, pode-se utilizar duas estratégias principais de interação entre a enzima e o analito:

- O processo metabólico do analito, neste caso a concentração do analito pode ser determinada através da medida da transformação catalítica do analito pela enzima;
- Inibição da atividade enzimática pelo analito, é um método alternativo de detecção baseado na determinação da diminuição da formação do produto enzimático[19].

1.2.2 Genossensores

Os dispositivos são chamados de genossensores ou biossensores de hibridização de DNA, quando fitas de DNA são imobilizadas na superficie do transdutor, neste caso a fita, única, de DNA age interagindo especificamente com uma fita complementar, a fim de formar um complexo estável helicoidal. Estes dispositivos apresentam especificidade de resposta, sendo esta a principal vantagem. As possibilidades de aplicação são as mais variadas, entretanto se concentram na detecção de agentes patogênicos[22].

1.2.3 Biossensores celulares

Biossensores celulares se utilizam de células como elemento reconhecedor, baseiam-se na sensibilidade celular em detectar alterações em relação a um ambiente fisiológico e o estudado. As alterações do meio produzem uma resposta devido à interação da célula com o ambiente, ou estimulo. Esses dispositivos são comumente chamados de biossensores microbianos, uma vez que sua aplicação se utiliza, geralmente, de estruturas celulares derivadas de bactérias e fungos, como biorreceptores, para detecção de moléculas ou o estado geral de

um ambiente. A principal aplicação dos biossensores celulares está no monitoramento ambiental, além da indústria alimentícia e de fermentação[22].

1.2.4 Sensores biomiméticos

Sensores biomiméticos são utilizados a fim de mimetizar um mecanismo de reconhecimento molecular biológico, neste caso o processo de mimetização classicamente envolve a atividade de enzimas, anticorpos, receptores, transportadores e proteínas transmembranares.

Esses sensores se costumeiramente utilizam como elemento de reconhecimento aptâmeros, que são oligonucleotídeos de fita simples, ou peptídeos. A aplicação desses sensores envolve o desenvolvimento de sondas, a principal vantagem da utilização desses sensores está relacionada com a possibilidade de diversidade química, disponibilidade de bibliotecas de peptídeos e a possibilidade de síntese do material desejado[22].

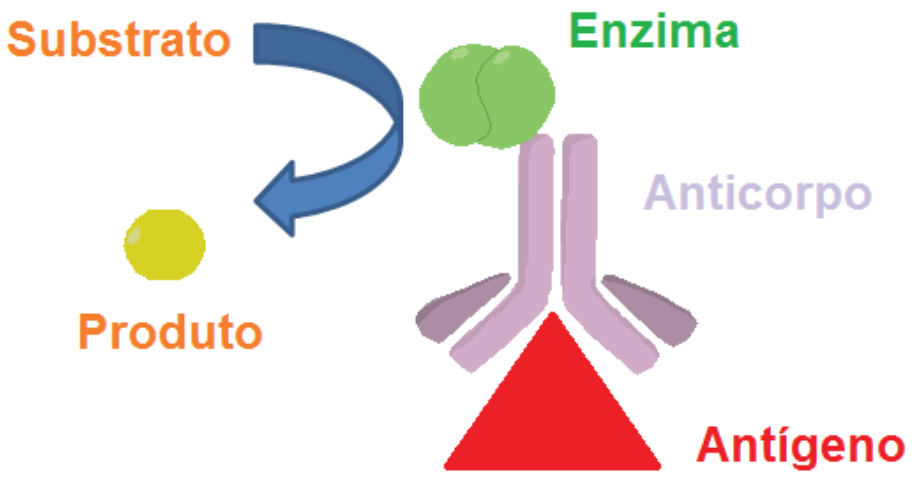
1.2.5 Imunossensores

Quando anticorpos, ou fragmentos, são utilizados como elemento reconhecedor molecular para uma análise específica – antígenos, a fim de formar um complexo estável, o dispositivo é denominado imunossensor. O atrativo deste dispositivo é a possibilidade de diagnóstico e controle de doenças e agentes patogênicos, *in vivo* ou *in vitro*, aliado as vantagens de biossensores[23].

A aplicação dos imunossensores depende de diversos aspectos, sejam estes a funcionalização da superfície, utilizada para imobilização das biomoléculas, a orientação dos anticorpos e a densidade superficial dos anticorpos, na plataforma de ancoramento. A detecção dos antígenos pode ser feita essencialmente de duas maneiras, indireta ou direta [24].

O método indireto envolve a utilização de biomarcadores enzimáticos na extremidade do anticorpo. Neste caso a interação antígeno-anticorpo é mensurada através da detecção do produto de uma reação enzimática. Como mostrado na FIGURA 8.

FIGURA 8: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR INDIRETO, OU BIOMARCADO.



FONTE: O autor.

O método direto, também chamado de *label-free*, envolve a detecção direta da formação do imunocomplexo, antígeno-anticorpo. Este ensaio restringe os métodos de detecção possíveis, entretanto simplifica o processo de construção do dispositivo, portanto diminui custos e tempo de preparo e análise [23]. Como mostrado na FIGURA 9.

FIGURA 9: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR DIRETO, OU LABEL-FREE.

FONTE: O autor.

Dentre os métodos de detecção possíveis para a configuração *label-free* estão o uso de detectores piezoelétricos, espectroscopia de impedância eletroquímica, ou a detecção eletroquímica por inibição de um sinal redox de uma sonda eletroativa. Tais métodos são propostos pois trata-se de macromoléculasque

apresentam atividade específica entre si, antígeno-anticorpo, o que dificulta a detecção das biomoléculas bem como de sua interação[25].

1.3 MÉTODO PIEZOELÉTRICO

É determinado como piezoeletricidade a capacidade dos cristais em gerar uma tensão elétrica em resposta ao estimulo, ou perturbação, de pressão mecânica, de modo que o efeito piezoelétrico é definido como a liberação, ou produção, de energia elétrica devido a compressão de alguns materiais. Dentre as aplicações do efeito piezoelétrico destaca-se a microbalança de cristal de quartzo (MCQ)[26].

A MCQ tem como principio de funcionamento a piezoeletricidade reversa, na qual a aplicação de um potencial elétrico leva a uma deformação mecânica do cristal. Quando o potencial aplicado sobre o cristal é de forma oscilatória a deformação mecânica gerada no cristal produz ondas de frequência mensurável, por um contador de frequência. A variação de massa na superfície do cristal interfere em suas propriedades mecânicas, diminuindo a frequência de oscilação. Essa variação de frequência é proporcional a massa depositada, e pode ser descrita pela equação de Sauerbrey (Equação 1)[26].

$$\Delta F = \frac{-2\Delta m f^2}{\mathrm{A}\sqrt{\mu \rho_{\mathrm{q}}}} = -C_f \Delta \mathrm{m} \qquad \textbf{(1)}$$

Sendo assim, a deposição de uma massa sobre a superfície do cristal altera a frequência de oscilação, diminuindo a frequência, permitindo relacionar a massa depositada com a medida de frequência de oscilação. A concepção de imunossensores baseados na utilização de MCQ, se da a partir da variação de frequência gerada devido a imobilização de um anticorpo bem como da formação de um imunocomplexo (interação antígeno-anticorpo), que pode ser então relacionada a um valor de massa.

1.4 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) pode ser entendida como a perturbação de um sistema eletroquímico ao qual é aplicado um sinal alternado de potencial ou corrente, de amplitude pequena em uma faixa de frequência. A impedância do sistema é a resultante da resposta da perturbação pela divisão complexa do potencial pela corrente. Impedância (Z) consiste na resistência elétrica de um circuito com corrente alternada, onde a Frequência deve ser diferente de zero, obedecendo a um análogo da lei de Ohm ($R = V I^{-1}$). Por meio da análise da impedância é possível investigar processos de interface fazendo associação dos elementos elétricos a cada evento relacionado as camadas superficiais (efeitos resistivos e capacitivos) e confrontá-los a um circuito equivalente. A EIS possibilita a caracterização da interface estabelecida entre eletrodo e solução de sistemas eletroquímicos [27].

Elaborar um imunossensor consiste na adição de varias camadas de caráter isolante sobre a superfície de um eletrodo condutor, o procedimento pode ser observado facilmente pela avaliação do perfil resistivo uma vez que cada etapa da estruração resulta em uma mudança no comportamento da resistividade superficial.

1.5 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas, sejam elas potenciométrica, amperométrica, voltamétrica ou condutométrica, podem ser aplicadas a inúmeros fins analíticos. Os sistemas de detecção eletroquímicos que empregam biomoléculas (como enzimas e anticorpos) para construção de sensores biológicos – biossensores, agregam a sensibilidade eletroquímica com a seletividade fornecida pelo componente biológico[16].

A voltametria é uma técnica baseada na medida de uma corrente elétrica, em uma célula eletroquímica de três eletrodos, em função de um potencial aplicado. São inúmeras as possibilidades de voltametrias, sendo as variações da técnica

relacionadas à forma com que o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho. Na voltametria cíclica, por exemplo, é realizada uma dupla varredura linear de potencial em relação ao tempo, no sentido direto e inverso [28]. Classicamente envolve a utilização de uma cela convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), contra-eletrodo (CE) e eletrodo de referência (ER). Por meio da aplicação de um potencial (medido em relação ao eletrodo de referência), as espécies de interesse são oxidadas ou reduzidas na superfície do ET, resultando em uma corrente elétrica mensurável, a qual é proporcional à concentração das espécies de interesse [29]

O potencial é variado de forma a atingir a energia suficiente para promover uma reação de oxidação ou redução de uma espécie eletroativa, a reação por sua vez gera um gradiente de corrente que pode ser mensurado, sendo a intensidade da corrente do processo proporcional à concentração das espécies eletroativas. O processo de conversão redox depende também da área eletroativa do eletrodo e da eficiência dessa superfície em promover a transferência eletrônica para a espécie eletroativa. Então, um bloqueio ou alteração na superfície de um eletrodo reflete em uma variação na taxa de conversão da espécie, diminuindo o sinal eletroquímico [28]. Esse efeito permite o uso da técnica para analisar mudanças na superfície de eletrodos, inclusive imunossensores, pois a adição de camadas ao eletrodo afeta diretamente a resposta voltamétrica referente a conversão de uma sonda eletroquímica. Assim, é possível avaliar a diminuição do sinal voltamétrico dessa espécie e relacioná-lo ao bloqueio da superfície ativa do eletrodo devido a ligação entre o antígeno e o anticorpo.

A escolha do ET depende de uma variedade de fatores, porém, comumente deve atender aos pré-requisitos: serem quimicamente inertes e apresentarem boa condutividade elétrica. Geralmente, os materiais amplamente utilizados são ouro ou platina metálicos e carbono em diferentes formas, como grafite, vítreo ou na forma do compósito pasta de carbono [16].

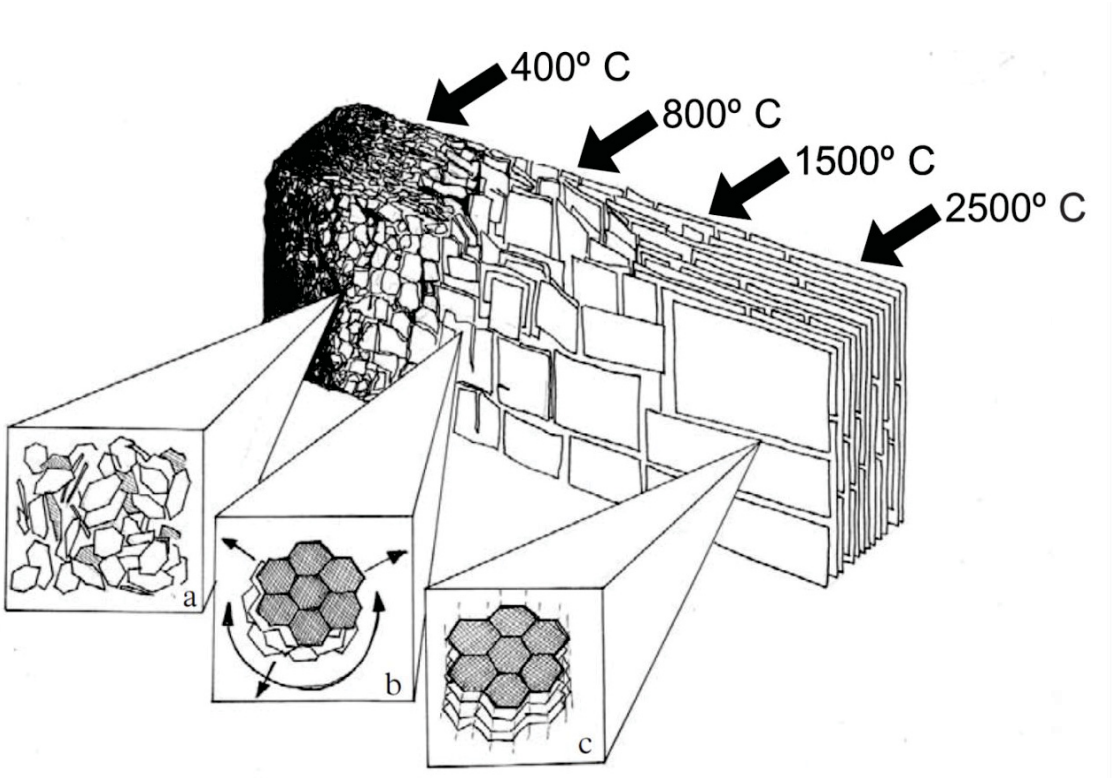
Os eletrodos compósitos, classificação na qual encontram-se os eletrodos de pasta de carbono (EPC), são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferentes naturezas. Os EPCs consistem em uma fase condutora, geralmente grafite, e uma fase aglutinante, usualmente um líquido orgânico. A principal vantagem de utilização desse tipo de material eletródico na construção de

sensores, em relação aos materiais convencionais anteriormente citados, é a possibilidade de modificação interna do material, fornecendo não somente a incorporação de espécies na superfície do eletrodo, mas também no seu interior de forma homogênea. A fácil renovação da superfície, bem como preparo simples e possibilidade de construção de eletrodos com diferentes modificações são outras vantagens atribuídas a este tipo de compósito. A desvantagem dos EPCs é a impossibilidade de aplicar o eletrodo em sistemas orgânicos, devido a solubilização do aglutinante no eletrólito orgânico [30,31].

A modificação de eletrodos de pasta de carbono tem como principal interesse atribuir e controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução, como forma de alterar a reatividade, ou mesmo possibilitar a diminuição da energia de ativação, alterando dessa forma a seletividade e a sensibilidade do sensor [31]. Diversos tipos de materiais e compostos podem ser utilizados para a modificação de eletrodos. Dentre os mais comuns, estão nanomateriais como nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas, complexos inorgânicos, material biológico, como enzimas, fragmentos de DNA, antígenos e anticorpos e materiais adsorventes, como argilas, zeólitas, dentre outros [30,32]. Em nosso grupo de pesquisa, diversos procedimentos tem sido realizados com relativo sucesso empregando um material carbonáceo, obtido a partir da pirólise de biomassa a baixas temperaturas e reduzida atmosfera de oxigênio, conhecido como biochar [33–35].

A composição estrutural do biochar é diretamente influenciada pela temperatura utilizada durante o processo de pirólise, sendo que temperaturas de pirólise de até 400 ºC favorecem a formação de um material amorfo, rico em grupos funcionais, por outro lado o uso de temperaturas superiores cominam com o aumento de estruturas organizadas de carbono, devido a diminuição das quantidades de hidrogênio e oxigênio [36]. Como representado na FIGURA 10.

FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BIOCHAR.



FONTE: O autor.

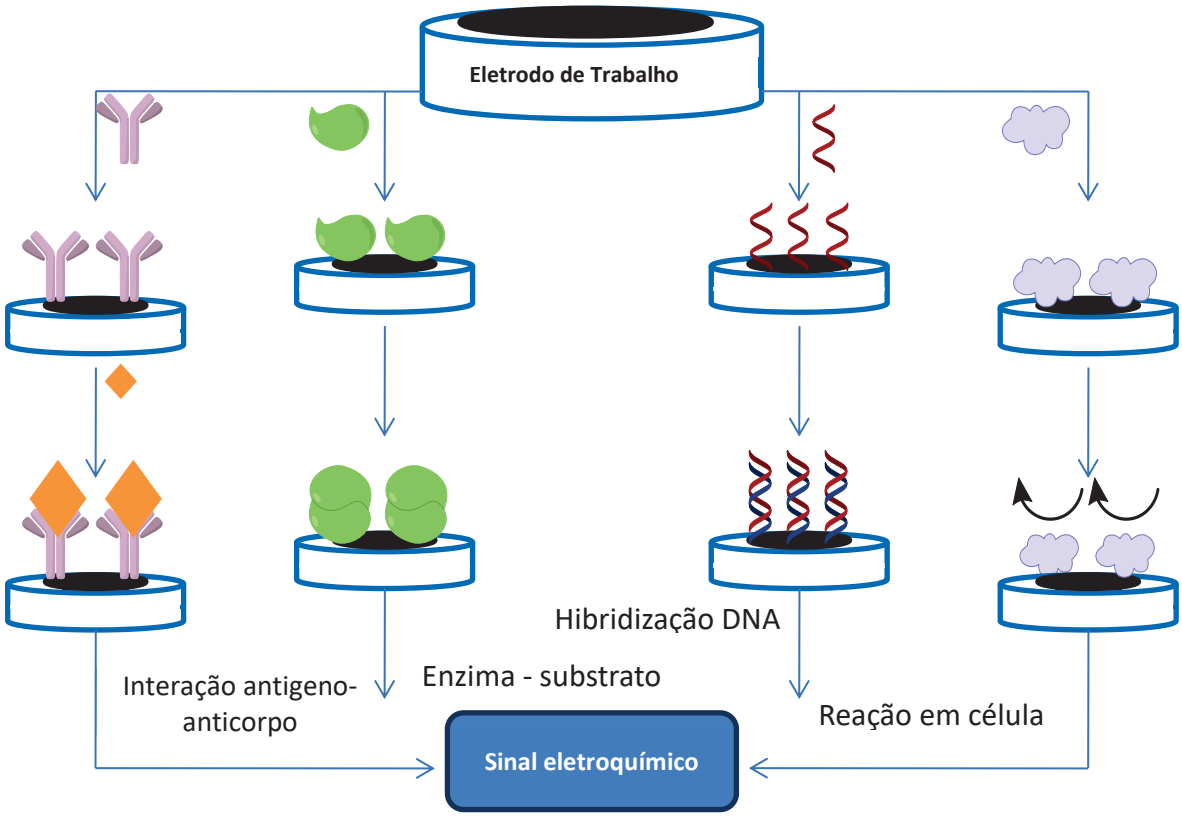
As condições de produção do biochar, visando aplicação como material modificador, consistem na utilização de baixas temperaturas de pirólise, com isso se obtém majoritariamente carbono amorfo com elevado grau de desordem na estrutura interna. Ainda, nesse material observa-se a presença de elevadas quantidades de grupos funcionais oxigenados, devido à presença de oxigênio e hidrogênio (provenientes da celulose, hemicelulose e lignina – constituintes básicos da biomassa) [33].

Dentre os grupos funcionais presentes, em sua grande maioria, encontram-se aromáticos a base de carbono, bem como quantidade significativa de grupos funcionais oxigenados: grupos carboxílicos, cetônicos e lactônicos. Os grupos funcionais carboxílicos, além de estarem atrelados a capacidade adsortiva do biochar, permitem também a utilização deste material para ancoramento de proteínas e consequentemente o desenvolvimento de biossensores utilizando esse material. O processo de ancoramento pode se dar por simples interação física superficial, neste caso a lixiviação superficial limita a aplicação, ou por ligação covalente[37].

1.6 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Biossensores eletroquímicos se baseiam no princípio de reconhecimento biológico específico atrelado ao monitoramento de alguma propriedade eletroquímica, (corrente, potencial, condutância, impedância e etc) e tem demonstrado resultados satisfatórios para controle ambiental, monitoramento no controle de qualidade alimentícia e aplicações clínicas e medicinais[38–40]. Este método de detecção possui o grande atrativo de menor tempo de resposta e baixo custo, quando comparado com métodos tradicionais. O sistema de trabalho envolve componentes de reconhecimento biológico, como enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, tecidos (animal ou vegetal), que é acoplado a um sensor, pelos métodos supracitados, gerando um sinal detectável que pode ser medido pelo transdutor, quando em contato com a amostra de interesse, como mostrado na FIGURA 11 [21].

FIGURA 11: ESQUEMA DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO.



FONTE: Adaptado de Elif Burcu e col.[41].

As interações específicas entre a molécula alvo e o elemento biológico reconhecedor podem produzir mudanças físico-químicas no sistema, que são mensuradas pelo transdutor, como variação de potencial, corrente, condutância, ou impedância. Sendo assim, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em quatro classes, de acordo com o sinal de transdução obtido, sendo estes:

- **Biossensores amperométricos:** A detecção amperométrica baseia-se na medida de uma corrente gerada a partir da aplicação de potencial fixo. O potencial fornece a energia necessária para a oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do ET, resultando em uma corrente elétrica mensurável, a qual é proporcional à concentração das espécies de interesse [29]. Esses sistemas são classicamente utilizados em sistemas enzimáticos, consiste no monitoramento da variação da corrente, gerada por uma reação redox, em função de um potencial constante. No caso de sistemas enzimáticos, mede-se a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Os mais conhecidos são os sensores de glicose, baseados no cofator oxigênio e na geração e detecção de peróxido de hidrogênio, como evidenciado nas Reações 2 e 3. Neste caso, a reação de oxidação enzimática da glicose tem como produto eletroativo o peróxido de hidrogênio, o qual pode ser reduzido eletroquimicamente, gerando um gradiente de corrente proporcional à concentração de glicose[42,43]

$$\text{Glicose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glicose Oxidase}} \text{Ácido Glucônico} + H_2O_2 \quad \textbf{(2)}$$

$$H_2O_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O \quad \textbf{(3)}$$

- **Biossensores potenciométricos:** A Potenciometria ou método potenciométrico é uma técnica eletroquímica que baseia-se na medida da diferença de potencial de uma célula eletroquímica de dois eletrodos, o eletrodo indicador e o de referência, na ausência de corrente apreciável. O eletrodo de referência, idealmente, apresenta um potencial que é conhecido, constante, e completamente insensível à composição da solução em estudo,

sendo assim as leituras de potencial registradas são em relação ao potencial desse eletrodo [44]. O eletrodo indicador por sua vez deve possuir resposta rápida e reprodutível a variações na atividade do íon que está sendo analisado em solução. A aplicação desses sistemas em monitoramento de reações biológicas fazem uso de eletrodos íon seletivos a fim de transduzir uma reação biológica em um sinal elétrico. Em termos simples, este sistema consiste em uma membrana, com o agente biológico imobilizado na superfície, por exemplo, do eletrodo combinado de vidro. Neste caso, a reação biocatalítica gera ou absorve íons H^+, causando variação da concentração de H^+ que corrobora com uma diferença de potencial entre o eletrodo e o meio, que é registrado pelo potenciômetro. Como é o exemplo da oxidação enzimática da penicilina, mostrado na Reação 4[42].

$$\text{Penicilina} \xrightarrow{\beta\text{-Lactamase}} \text{Ácido Peniciloico} + H^+ \qquad \textbf{(4)}$$

- **Biossensores impedimétricos:** Baseiam-se namedida da variação da impedância do sistema. Uma perturbação é aplicada (de potencial ou de corrente) em um intervalo de frequências, e a defasagem da resposta (em corrente ou potencial respectivamente) é calculada em termos de elementos que podem fornecer comportamentos resistivos, capacitivos e/ou indutivos da interface eletródica[45]. Estes sistemas podem ser aplicados na construção de imunossensores, uma vez que estes se baseiam na adição de camadas não condutoras sobre a superfície de um eletrodo condutor, esse processo pode ser facilmente visualizado por impedância pois, por exemplo, a inserção de camadas aumenta a resistência à passagem de elétrons na célula, levando a uma mudança no comportamento da resposta obtida[42].
- **Biossensores voltamétricos:** Classicamente se utilizam do sinal redox de uma sonda, de perfil conhecido, para verificação e quantificação de estruturas biológicas ancoradas na superfície do ET. Análogo ao biossensor impedimétrico, processos imobilização de proteínas no ET conferem a superfície uma característica mais isolante, alterando processos de

transferência de elétrons e causando um impedimento estérico superficial, que impede a sonda de interagir efetivamente com a superfície do eletrodo e promover uma reação redox. Sendo assim, a imobilização de uma proteína ou formação de um imunocomplexo, por exemplo, diminuem a intensidade de corrente da sonda, a qual pode ser relacionada com a concentração de proteínas que efetivamente se ligaram a superfície[46].

Quando anticorpos, ou fragmentos, são utilizados como elemento reconhecedor molecular para uma análise específica – antígenos, a fim de formar um complexo estável, o dispositivo é denominado imunossensor. O atrativo deste dispositivo é a possibilidade de diagnóstico e controle de doenças e agentes patogênicos, *in vivo* ou *in vitro*, aliado as vantagens de biossensores[23].

A aplicação de imunossensores eletroquímicos é fundamentada na seletividade de anticorpos por antígenos. O reconhecimento de um antígeno pode ocorrer por vários linfócitos, o que leva a ativação de inúmeros clones diferentes. Cada clone reconhece ou se liga a uma parte diferente da estrutura do antígeno, esta estrutura é denominada epitopo, a qual é efetivamente reconhecida pelo anticorpo para que a interação antígeno-anticorpo possa ocorrer [21].

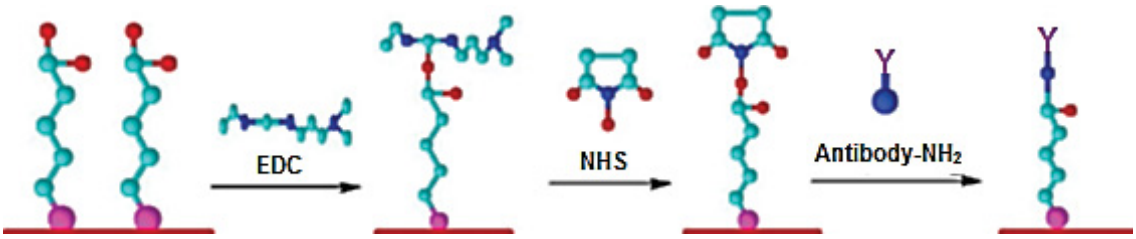
Cada antígeno pode possuir vários epitopos, dessa maneira um mesmo antígeno pode ser reconhecido por vários linfócitos diferentes. Anticorpos policlonais são anticorpos que possuem diferentes clones, se originam de diferentes linfócitos B, o que significa que reagem com vários epitopos distintos do antígeno (por exemplo várias partes de uma proteína). Anticorpos monoclonais são um tipo de anticorpo que provém de somente um linfócito B, clonado. Desta forma, este anticorpo se liga somente a um epitopo de uma única forma e região[47].

O processo de construção de imunossensores classicamente utiliza-se de eletrodos com superfície de ouro, entretanto para imobilização de proteínas em superfícies metálicas se faz necessário a utilização de camadas auto-organizadas, que servem de ponte entre a estrutura metálica e a proteína. As camadas auto-organizadas são definidas como moléculas orgânicas que formam conjuntos moleculares organizados em forma de camada espontaneamente, seja por adsorção ou ligação química. Originalmente na formação das monocamadas em superfícies de ouro, utiliza-se de estruturas orgânicas que apresentam um grupamento tiol, o qual se liga a superfície de ouro em uma extremidade e um

grupamento ácido carboxílico na outra extremidade da molécula, o ácido carboxílico seria componente majoritário no processo de ancoramento protéico, utilizando reações de ligação cruzada[16,29]. Entretanto a utilização destas camadas promove o bloqueio da superfície eletródica, sendo assim prejudicam processos eletroquímicos, uma vez que agem como uma camada isolante na superfície eletroativa, dificultando processos de transferência de elétrons. Alternativamente, diversos tipos de materiais e compostos podem ser utilizados para a modificação de eletrodos visando sobrepor a problemática das camadas auto-organizadas. Dentre os mais comuns estão os materiais que já apresentam grupos funcionais oxigenados, possibilitando ancoramento direto de biomoléculas no material, como é o caso dos nanotubos de carbono, grafeno ou do biochar[48,49].

O método de ancoramento em grupos funcionais oxigenados se dá via ligação covalente, a qual consiste na formação de uma ligação entre grupos carboxílicos superficiais presentes no biochar e a proteína. Neste caso a superfície do biochar é ativada com moléculas como NHS (N-Hidroxisuccinimida) e EDC (cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), que permitem a formação de uma ligação covalente, por substituição, entre a proteína e o grupo carboxílico, fornecendo uma imobilização estável (FIGURA 12)[42].

FIGURA 12: PROCESSO DE LIGAÇÃO COVALENTE POR SUBSTITUIÇÃO.



FONTE: adaptado de Arya e col. [50].

Partindo dessa premissa, Eissa S. et. Al. [48] construíram um imunossensor voltamétrico, *label-free*, para detecção de ovalbumina alergênica, proteína alergênica proveniente de ovos. Para isso, utilizaram um eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno, os grupos superficiais oxigenados possibilitaram a imobilização dos anticorpos contra ovalbumina de forma direta na superfície do grafeno, através da utilização da reação cruzada com EDC / NHS. Para detecção da formação do imunocomplexo, ou seja do analito ovoalbumina, foi utilizada a

técnica de voltametria cíclica e sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$. A detecção consistiu na verificação da diminuição da intensidade de corrente dos processos redox da sonda a medida que a quantidade de imunocomplexo formado aumentava, variando-se a concentração de 1,0 pg mL^{-1} a 0.5 µg mL^{-1}, a partir da curva de calibração obtiveram um limite de detecção de 0,83 pg mL^{-1}.

Em um viés de aplicação clínica, S. L. R. Gomes-Filho et. Al.[49], construíram um imunossensor utilizando nanotubos de carbono, *single-wall,* para imobilização do anticorpo contra troponina cardíaca T, visando monitoramento da troponina cardíaca, marcador proteico para infarto do miocárdio. A imobilização foi realizada diretamente aos nanotubos e o processo de detecção via voltametria cíclica, utilizando sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$. A partir da inibição do sinal de corrente da sonda obtiveram faixa linear de 0,1 a 10 ng mL^{-1} com limite de detecção de 0,033 ng mL^{-1}.

Sendo assim, os imunossensores eletroquímicos apresentam-se como uma alternativa viável em relação ao ELISA. Tendo em vista que, há poucos interferentes eletroativos em amostras biológicas, tornando atrativos estes métodos para utilização em amostras complexas e coloridas, o qual é o principal fator para falsos positivos nos ensaios ELISA. Ainda, apresentam baixo custo de análise, simples manuseio e curto tempo de resposta, tornando-os interessantes para o desenvolvimento de metodologias alternativas para detecção e controle da doença[16,29].

No presente trabalho propõe-se a construção de um eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar, visando à imobilização de proteínas em sua superfície para construção de um imunossensor. Dentre as vantagens da utilização deste material, destaca-se a possibilidade de imobilização, via covalente, de forma direta em sua superfície, que corrobora com menor bloqueio da superfície eletroativa. Assim como, maior simplicidade nas etapas de construção e menor tempo, visto que a abordagem *label-free* aliado as características do biochar reduzem as etapas de construção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir dois imunossensores do tipo *label-free* para detecção eletroquímica do *Hantavirus araucária* e dos anticorpos contra Hantavírus utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar uma plataforma de pasta de carbono e o biochar para ancorar as proteínas;
- Construir o imunossensor para detecção da nucleoproteína do *Hantavirus araucária* (Ag), utilizando seus anticorpos como sistema de reconhecimento biológico, visando detecção prévia ao período sintomático.
- Construir o imunossensor para detecção do anticorpo, utilizando Ag como elemento de reconhecimento biológico, possibilitando futura aplicação para o diagnóstico em fase inicial e intermediária da doença;
- Realizar o teste de seletividade e amostra real em ambos os dispositivos para validação do imunossensor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DO BIOCHAR

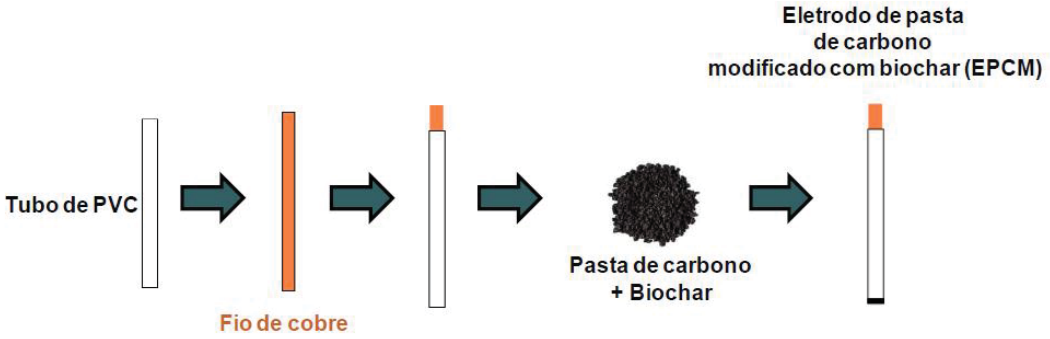
Foi utilizada a metodologia já descrita em literatura para preparação do biochar, de acordo com o trabalho de Mangrich *et. al*. [51]. O biochar é obtido pela pirólise da biomassa (farelo de mamona) sob condições de atmosfera com baixa concentração de oxigênio, durante 60min a 400ºC, com rampa de aquecimento de 5 ºC min^{-1}em forno EDG FT-40. Prévio a etapa de pirólise da biomassa, o farelo de mamona foi moído em moinho de bolas e separado por granulometria de 40 a 80 mesh.

A amostra de biochar foi submetida a um processo de tratamento superficial por ativação química, visando oaumento da quantidade de grupos funcionais superficiais, e amelhora da capacidade adsortiva do material. Inicialmente o biochar foi tratado em meio de ácido nítrico 3,0 mol L^{-1} em refluxo a 70°C durante 6 horas.

3.2 CONSTRUÇÃO DO EPC COM BIOCHAR

Preparou-se a pasta de carbono modificada (EPCMB) empregando a seguinte composição: 25 % de óleo mineral (Aldrich), (55 %) de pó de grafite (Aldrich) e 20 % do agente modificador, biochar tratado. O preparo da pasta foi realizado pela homogeneização dos seus componentes,e na sequência compactadaem um suporte de PVC (Φint = 3,0 mm), contendo no interior uma haste de cobre metálico, como contato elétrico. A pasta de carbono não modificada foi confeccionada da mesma maneira, porém sem o agente modificador, na proporção de 25% de óleo mineral e 75% de grafite. A construção do EPCMB é representada na FIGURA 13.

FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DO EPCM.

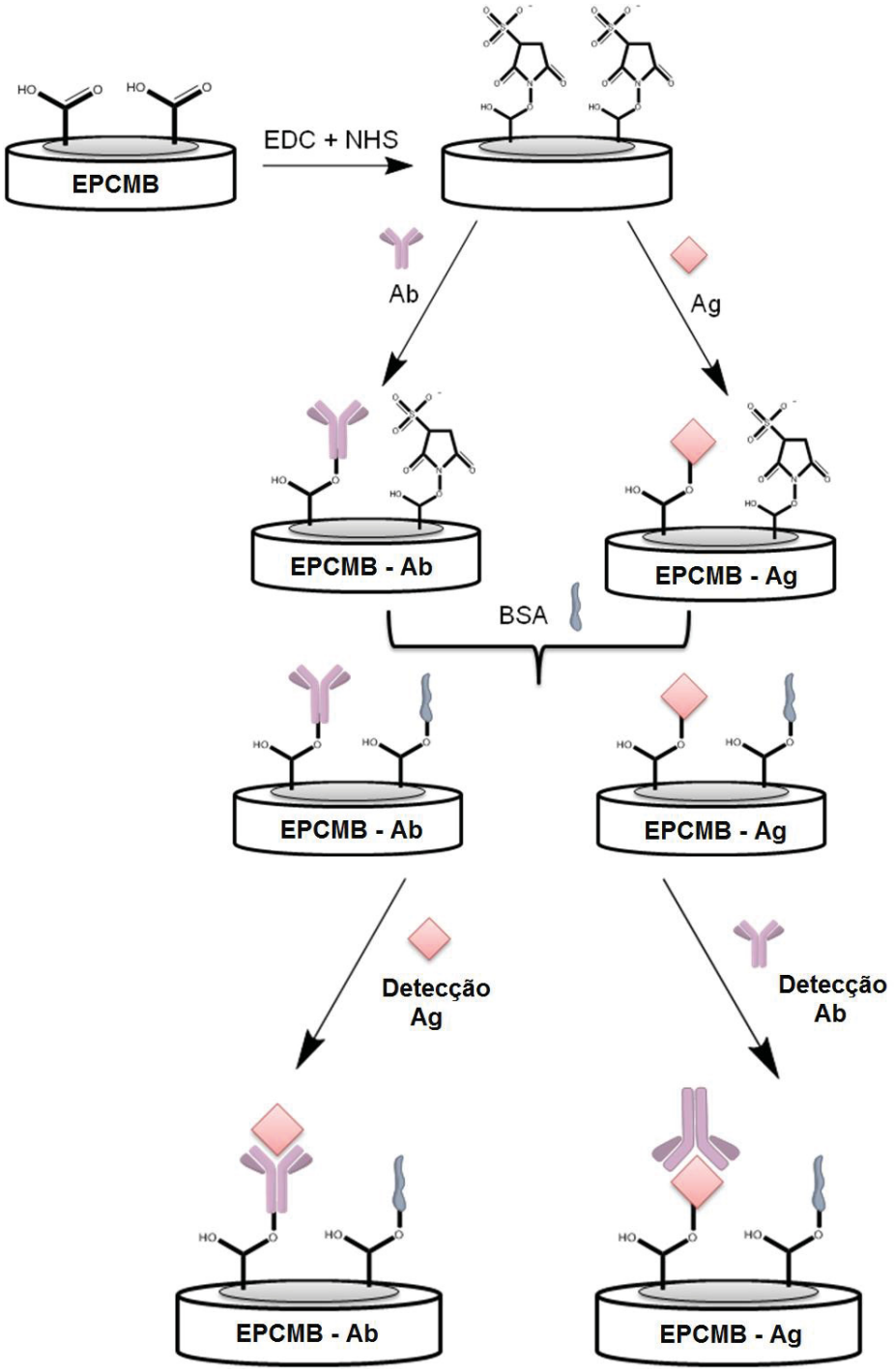


FONTE: O autor.

3.3 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Os grupamentos carboxílicos presentes na superfície do EPCMB foram submetidos à ativação pela reação de ligação cruzada com EDC (Sigma Aldrich) e NHS (Sigma Aldrich), ambos na concentração de 5,0 mmol L^{-1} em tampão acetato pH 4,5, por imersão e agitação durante 15 minutos,para a formação da ponte covalente entre a superfície e a proteína ancorada. O anticorpo (de 0,4 mg mL^{-1})e o antígeno (1,0 µg mL^{-1}) foram ancorados pela técnica de *dropcasting*utilizando 5,0µL das soluções, bem como a albumina de soro bovino (BSA) (1,0 mg mL^{-1}), a qual tem como função bloquear sítios de ligação inespecífica. O antígeno, consiste na nucleoproteína (Ag) do organismo *Hantavírus araucária* obtido pelo sistema de expressão eucariótico *Escherichia coli,* e o anticorpo, de especificidade anti-NP do Hantavírus, tipo IgG2b de cadeia leve kappa, foram fornecidos pelo laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ)[52]. A representação ilustrativa do processo de construção dos dispositivos está apresentada na Figura 14.

FIGURA 14: ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO PROCESSO ANCORAMENTO DAS PROTEINAS.



FONTE: O autor.

Após a etapa de imobilização do anticorpo ou do antígeno, adiciona-se albumina de sorobovino (BSA), 1 mg mL^{-1} em tampão fosfato salino pH 7,4, visando ocupar os sítios de ligação inespecíficos não ocupados pelas proteínas.

3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato µAutolab Tipo III, gerenciado pelo programa NOVA 1.11 para coleta de dados. Foi empregada uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos, sendo eletrodo de trabalho o EPCM com biochar, contra-eletrodo de platina e referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}).A avaliação das etapas de construção do dispositivo foi realizada a partir de dados obtidos pela técnica de voltametria cíclica utilizando $K_3[Fe(CN)_6]$ como sonda eletroquímica, a uma velocidade de varredura de 50,0 mV s^{-1}. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em solução de 1.0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ com frequência variando de 0,1 Hz a 100 kHz, e amplitude AC de 25 mV em potencial de circuito aberto.

3.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A amostra de biocharutilizada para construção do EPCMBfoi submetida a medidas de FTIR a fim de caracterização estrutural. O carbonáceo foihomogeneizadocom KBr, previamente seco, prensados para formar uma pastilha e as medidas foram realizadas empregando um espectrofotômetro BOMEN, disponibilizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Foram feitos 64 *scans* de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens obtidas da superfície dos eletrodos foram realizadas com Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI, modelo Quanta 450, com fonte de elétrons FEG (*field emission gun*), que possui resolução de 1,0 nm. Todas as imagens foram obtidas com uma aceleração de voltagem de 10 kV e com detectores de elétrons secundários (SE).

3.7 TITULAÇÃO BASEADA NO MÉTODO BOEHM

Foram realizadas as titulações dos grupamentos ácidos totais presentes na superfície do biochar tratado e não tratado empregando o procedimento

inicialmente proposto por Boehm [53]. O procedimento envolve uma retrotitulação utilizando hidróxido de sódio para quantificação de ácidos totais superficiais.

Inicialmente 100 mg de amostra foram adicionados em 10 mL de NaOH padronizado, 0,1 mol L^{-1}, a mistura permaneceu sob agitação durante 6 horas. Posteriormente, a amostra de biochar foi filtrada e lavada, então adicionou-se 10 mL de HCl 0,1 mol L^{-1}, padronizado, e agitada por 1 hora. Em seguida realizou-se a titulação potenciométrica, utilizando titulador automático Metrohm tritino, com solução de NaOH, padronizada, 0,1 mol L^{-1}. A partir do volume gasto de NaOH durante as titulações pode-se estipular a quantidade de ácidos totais superficiais.

3.8 MÉTODO B.E.T.

Informações sobre a área superficial, tamanho de poro e distribuição foram obtidas pelo método B.E.T. (Brunnauer, Emmett e Teller), utilizando Quantachrome porosímetro modelo new1200.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PREPARAÇÃO E ATIVAÇÃO DO BIOCHAR

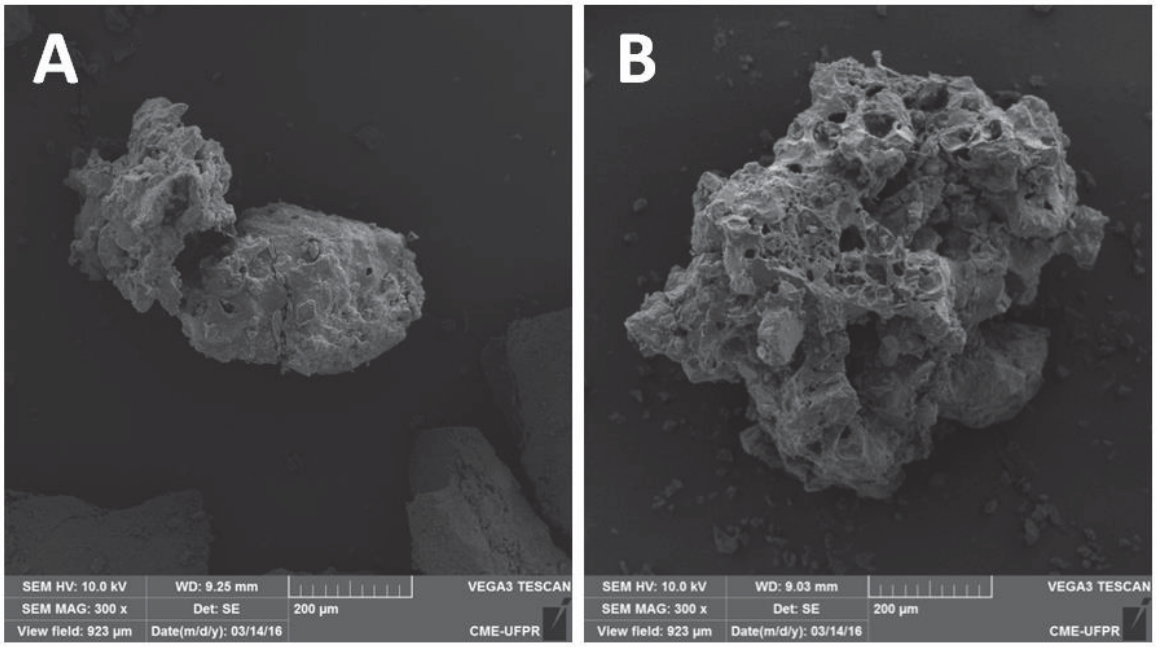
O biochar foi preparado segundo condições de pirólise pré-estabelecidas por Mangrich *et. al*. [51],com um rendimento de 36,96% ± 2,63% (n=3), valor satisfatório, tendo em vista que durante o processo de pirólise a biomassa sofre desidratação e degradação e, consequentemente, perda de massa.

A amostra de biochar preparada foi submetida ao processo de ativação superficial, empregando uma solução de ácido nítrico em um sistema de refluxo, como já mencionado. A ativação tem como finalidade aumentar a quantidade de grupos funcionais oxigenados superficiais e, como consequência, facilitar o ancoramento proteico via ácidos carboxílicos. É reportado em literatura que processos de ativação de materiais carbonáceos em condições ácidas geralmente resultam em alterações estruturais e morfológicas[54,55].Sendo assim, foram realizados estudos de caracterização das amostras de biochar sem e com tratamento ácido. Inicialmente, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e infravermelho(FTIR).

4.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS

As medidas de MEV foram realizadas nas amostras de biochar tratado e não tratado e estão representadas na FIGURA 15. Todas as imagens são representativas da amostra analisada.

FIGURA 15: (A) IMAGENS MEV DO BIOCHAR APÓS TRATAMENTO ÁCIDO COM AUMENTO DE 300 VEZES; (B) IMAGENS MEV DO BIOCHAR COM AUMENTO DE 300 VEZES.



A partir das imagens de MEV obtidas,foi possível observar alterações morfológicas entre as amostras de biochar ativado(15A) e seu precursor(15B). Dentre estas modificações percebeu-se que as amostras nas quais foi empregado o tratamento químico ácido,apresentaram aparente diminuição do tamanho das partículas, além de uma variação de porosidade e rugosidade superficial concordando com trabalhos similares reportados na literatura [54,55]. Alguns autores sugerem que o tempo de refluxo para o tratamento ácido de materiais carbonáceos é fator predominante na alteração do volume dos poros, sendo que tempos mais prolongados apresentam a tendência de diminuição do volume de poro[56]. As alterações relacionadas à área superficial e volume de poro puderam ser melhor elucidadas pelo método de BET, apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR.

Amostra	**Área superficial (m^2 g^{-1})**	**Volume de poro (cm^{-1} g^{-1})**	**Diâmetro de poro (Å)**
Biochar precursor	4,80	$3,34 \times 10^{-3}$	35,78
Biochar ativado	6,15	$5,93 \times 10^{-3}$	40,74

Dessa forma, o aumento do volume dos poros e de área superficial observada através do método de BET após o tratamento ácido das amostras de

biochar, podem ser explicadas pela oxidação promovida pelo tratamento com HNO_3, a qual favorece a formação de grupos funcionais oxigenados nas paredes ou arestas das aberturas dos poros do material,embora não seja possível de se observar nas imagens[57,58]. O aumento dos parâmetros de área, volume e diâmetro, obtidos para o biochar ativado, é característica fundamental para a construção de um imunossensor, uma vez que a imobilização de estruturas protéicas é realizada na superfície do biochar, a maior área obtida permite maior acomodação das proteínas bem como maior quantidade.

Ainda, observaram-se estruturas que se repetem ao longo de ambas amostras analisadas, como estruturas de morfologia amorfa, esperadas em pirólise de materiais carbonáceos. As imagens evidenciaram também uma estrutura com rugosidade e irregularidade, as quais possibilitam a imobilização de proteínas ou outro tipo de material pela simples adsorção física, além da interação com os grupos funcionais na superfície do material.

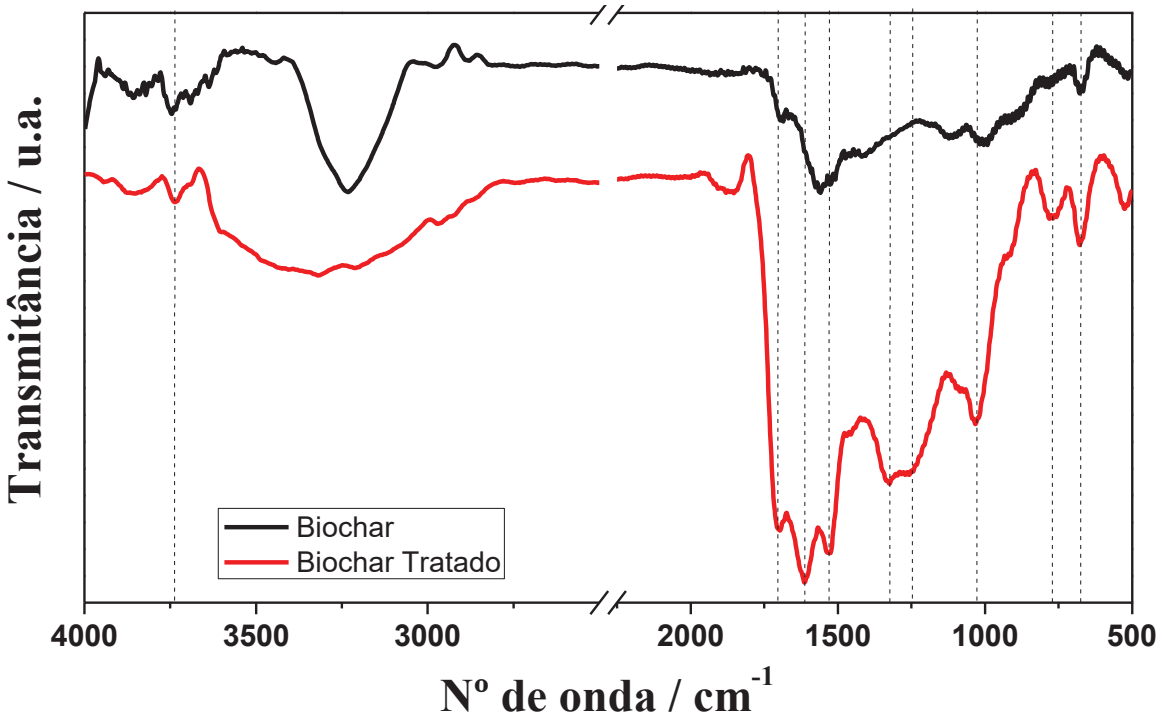
4.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR).

As principais características do biochar dependem das condições de pirólise para obtenção do material (temperatura, tempo de residência, baixa quantidade de oxigênio e etc) e a matéria prima utilizada.A variação dessas condições garante ao material a possibilidade de modulação de porosidade e funcionalizações, tanto tamanho quanto a quantidade de ambos. Essa modulação influência de forma direta nas interações que ocorrem em sua superfície[59].

Os grupos funcionais presentes no biochar podem ser evidenciados a partir de análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Entretanto, a interpretação de espectros FTIR de amostras de biochar é complexa, uma vez que a amostra é rica em grupos funcionais e, cada grupo, pode apresentar múltiplas bandas em diversos números de onda, de forma que as bandas obtidas no espectro podem representar a contribuição de grupos funcionais em uma mesma região, decorrente da sobreposição das bandas[60].

A FIGURA 16 apresenta os espectros de FTIR obtidos para a amostra de biochar e do biochar tratado com HNO_3.

FIGURA 16: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA O BIOCHAR E BIOCHAR TRATADO.



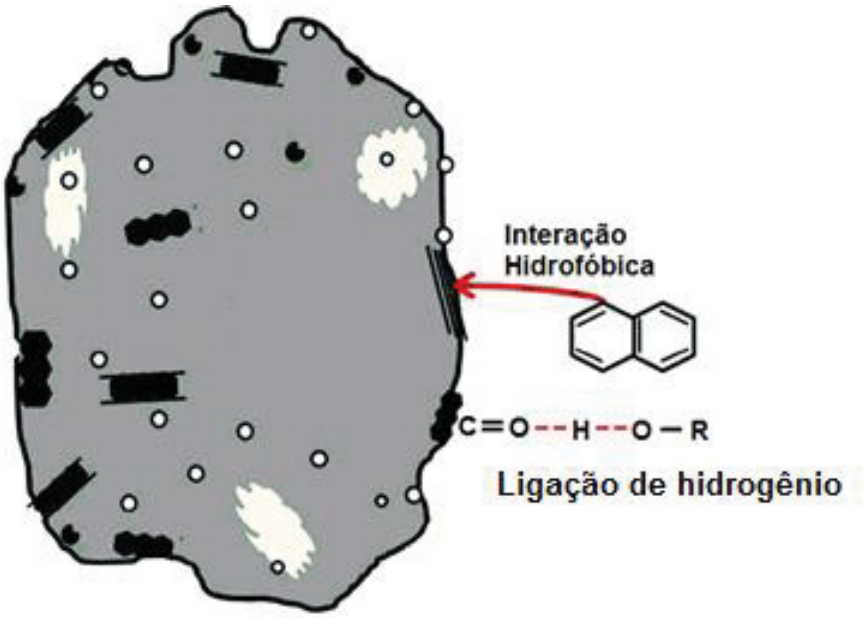
O espectro de FTIR obtido para o biochar sem tratamento ácido apresenta bandas específicas nas regiões em 3300 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações O-H presentes no biocarvão, nas regiões de 1700, 1500 e 1090 cm^{-1} que são referentes a estiramentos assimétricos de C=O, O-H e C-O respectivamente, de grupamentos fenólicos e carboxílicos [60–62]. Quando se refere ao biochar tratado foi possível observar alargamento da banda entre 3600 – 3100 cm^{-1}, que representa o estiramento do O-H dos grupos carboxílicos [60]. A banda entre 1715 – 1520 cm^{-1} corresponde à sobreposição de estiramentos para C=O em grupos carboxílicos, cetônicos e lactônicos, e ainda C=C em componentes aromáticos [61].Já é relatado em literatura que vibrações entre 1400 e 1200 cm^{-1} podem corresponder à presença de grupamentos hidroxilas presentes em fenóis e ácidos carboxílicos [63].Neste caso, a banda possivelmente é característica de ânions carboxilatos, que ocorre entre 1180 e 1300 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C – O, o qual só é observado na amostra de biochar tratado, em função do tratamento ácido, evidenciando a possível formação de grupos carboxílicos. Uma banda foi verificada entre 1000 e 900 cm^{-1}, característica do estiramento assimétrico C-O-C que pode ser atribuído à presença de componentes celulósicos da amostra [63].

As bandas presentes em ambos os espectros de FTIR indicaram que a síntese do biochar, proveniente do farelo de mamona, gerou majoritariamente

compostos aromáticos, bem como quantidade significativa de grupos funcionais oxigenados. A partir da comparação dos FTIR entre o biochar tratado e o sem tratamento percebeu-se maior variedadede funcionalizações presentes na superfície do biochar tratado. A confirmação da formação de grupos funcionaiscarboxílicos foi realizada por titulaçãopotenciométrica,utilizando método deBoehm[64], na qual o biochar precursor apresentou equivalente a 4,02 mmol g^{-1} de ácidos totais, enquanto o biochar tratado apresentou 7,26 mmol g^{-1} de ácidos totais.

A partir disso, especula-se que a interação superficial entre moléculas orgânicas (proteínas) e o biochar pode acontecer de duas maneiras, interação entre sítios hidrofóbicos e ligação de hidrogênio como mostrado na FIGURA 17.

FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO DO BIOCHAR

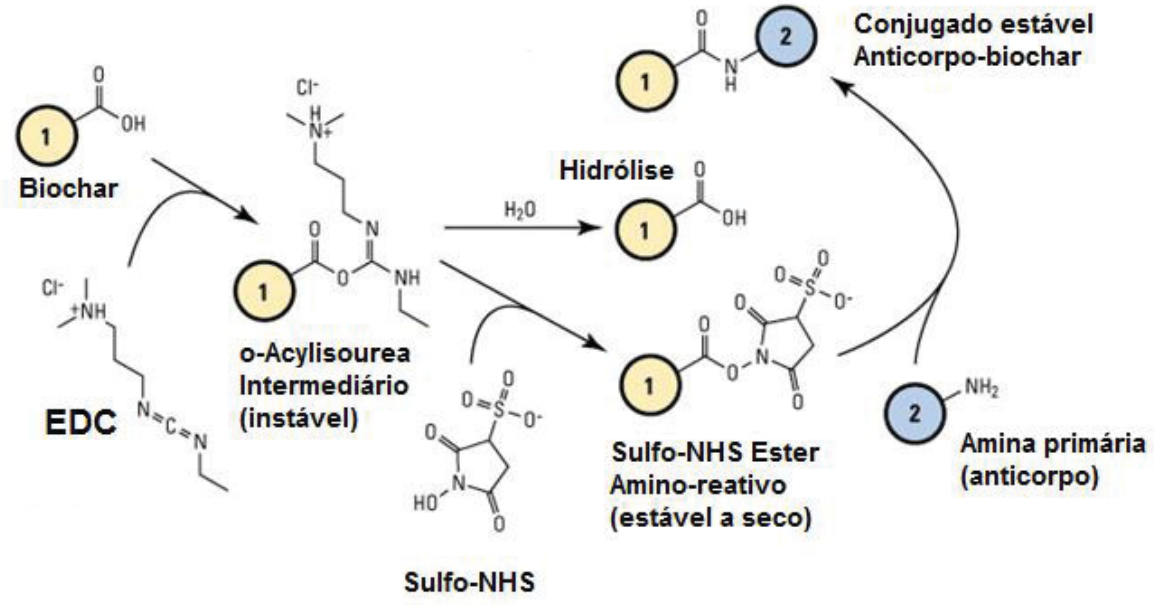


4.4 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE ANALÍTICA DO DISPOSITIVO

Estudos iniciais envolveram a verificação da viabilidade de aplicação do biochar como modificador do eletrodo para ancoramento proteico, como alternativa aos eletrodos de ouro normalmente utilizados, conforme já mencionado anteriormente. Para isso o dispositivo proposto utilizando EPCMB com biochar tratado foi submetido as etapas de modificação da sua superfície a fim de ancorar o anticorpo contra o *Hantavirus araucária*. Primeiramente foi realizada a etapa de ativação superficial com os agentes de ligação cruzada EDC e Sulfo-NHS, pela

simples imersão do eletrodo em solução contendo os modificadores em solução tampão fosfato 0,02 mol L^{-1} e pH 4,5, e agitado durante 15 minutos, condição já descrita em literatura que tende ao favorecimento da formação do reativo amínico sulfo-NHS[65,66]. Neste caso, o produto da reação (sulfo-NHS) apresenta baixa estabilidade, podendo ser facilmente substituído por aminas primarias[67], como descreve a FIGURA18.

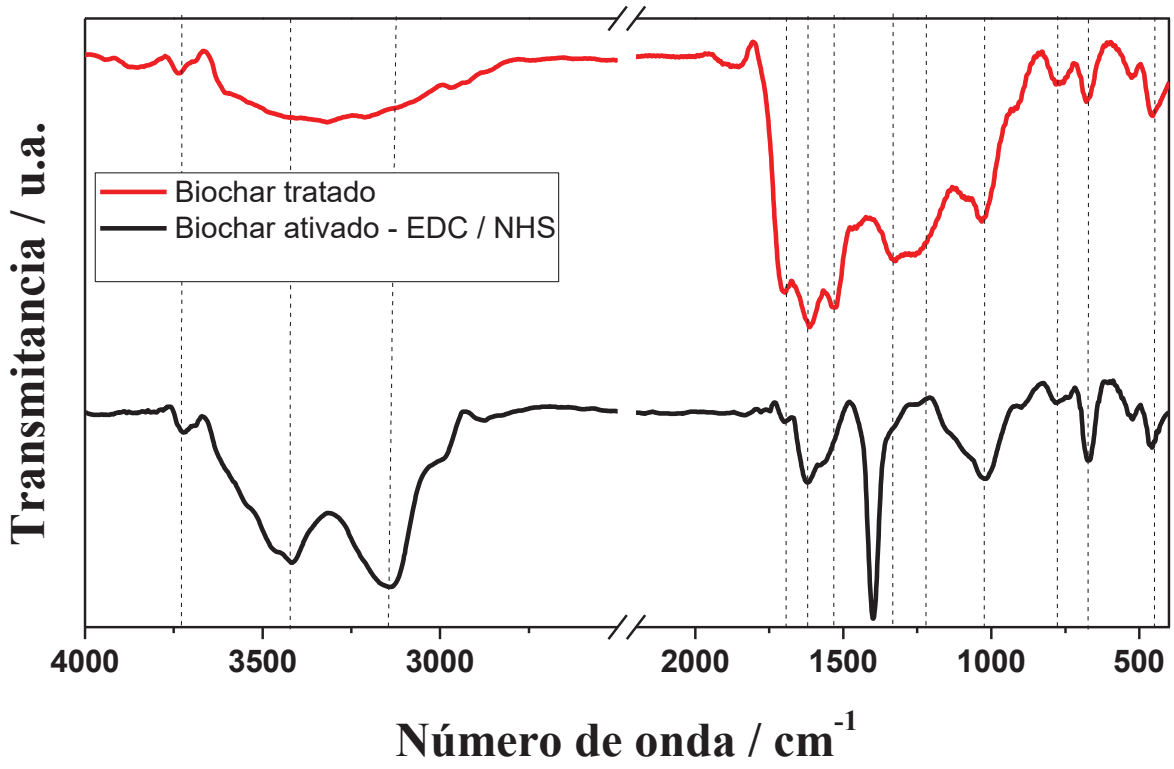
FIGURA 18: MECANISMO DE REAÇÃO DO EDC-NHS



FONTE: Adaptado de Thermofisher [68] .

A fim de confirmar a presença da reação entre EDC e NHS com o biochar, foram realizadas medidas empregando a técnica de espectroscopia de infravermelho,sendo os resultados mostrados na FIGURA 19.

FIGURA 19: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA O BIOCHAR TRATADO E BIOCHAR ATIVADO COM EDC+NHS.

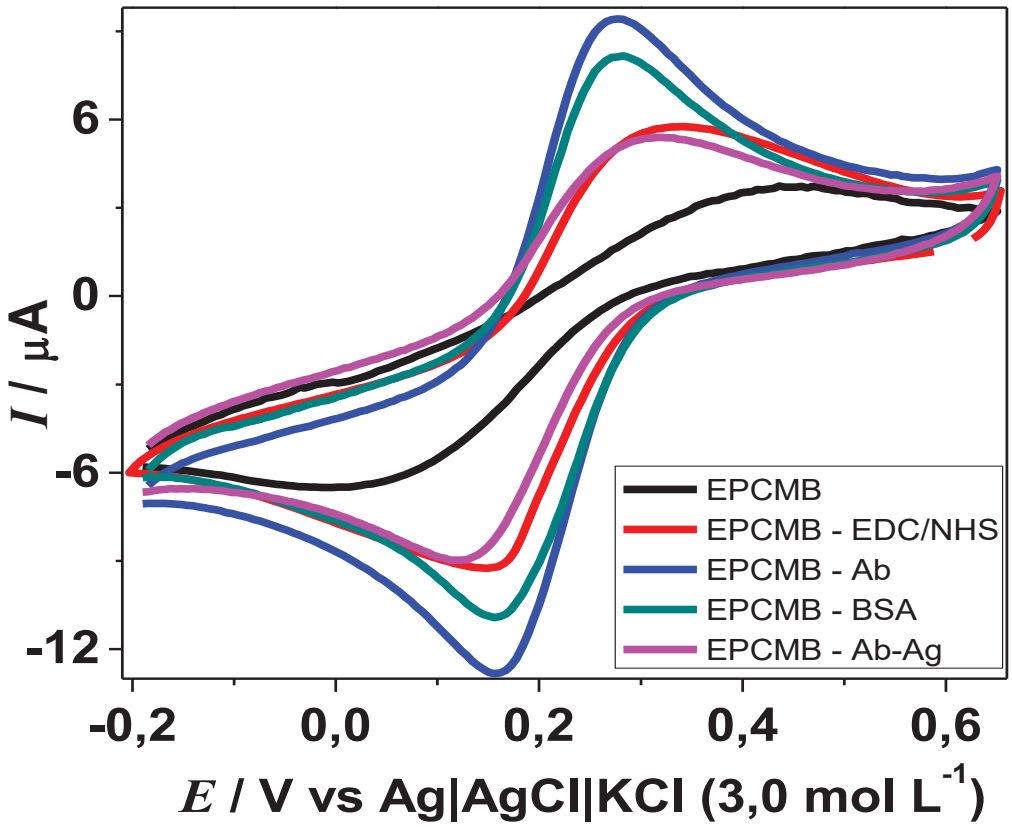


Quando refere-se ao biochar tratado é possível observar uma banda larga entre 3600 – 3100 cm^{-1}, que representa o estiramento do O-H dos grupos carboxílicos[60], a mesma região do espectro, referente ao biochar ativado com EDC e NHS apresenta divisão da banda larga, em duas bandas, nas regiões de 3422 e 3142 cm^{-1}, característico de estiramento N-H de aminas e amidas primárias e secundárias[67]. A presença de tais grupos nitrogenados pode ser proveniente da matriz dos modificadores, porém ainda pode-se atribuir a existência de amidas devido a formação da ligação entre os agentes ativadores, EDC-NHS com o biochar, através da interação do ácido carboxílico com as bases nitrogenadas, formando então estruturas a base de amidas. Ainda, pode haver contribuição, nessa região de banda, de resquícios de ácidos carboxílicos não ativados pela reação. A banda entre 1715 – 1520 cm^{-1}, a qual corresponde à sobreposição de estiramentos para C=O em grupos carboxílicos[62], cetônicos e lactônicos, apresenta alteração. As três bandas nessa região, as quais eram bem definidas no biochar tratado, passaram a apresentar sobreposição de picos, na amostra de biochar ativado com EDC e NHS, principalmente em 1620 e 1530 cm^{-1}, região que coincide com a frequência de deformação de aminas primárias, como já proposto anteriormente, proveniente dos ativadores. A banda que ocorre entre 1300 a 1180

cm^{-1}, característica de ânions carboxilatos, devido ao estiramento da ligação C – O, só é observada na amostra de biochar tratado, alteração que não era esperada, uma vez que a interação de EDC e NHS só ocorre com oxigênios de ácidos carboxílicos. Sendo assim, o infravermelho apresenta indícios da ativação superficial do biochar, com EDC e NHS, que serão utilizados para ancoramento de estruturas protéicas[66].

A verificação das etapas de modificação superficial e ancoramento foram confirmadas em meio de ferricianeto de potássio, 1,0 mmol L^{-1},utilizando a técnica de voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de 50,0 mV s^{-1}, visto que é uma sonda muito difundida em literatura para avaliação de processos de ancoramento e caracterização eletroquímica de biossensores [32,69,70].Os resultados obtidos podem ser observados na FIGURA 20.

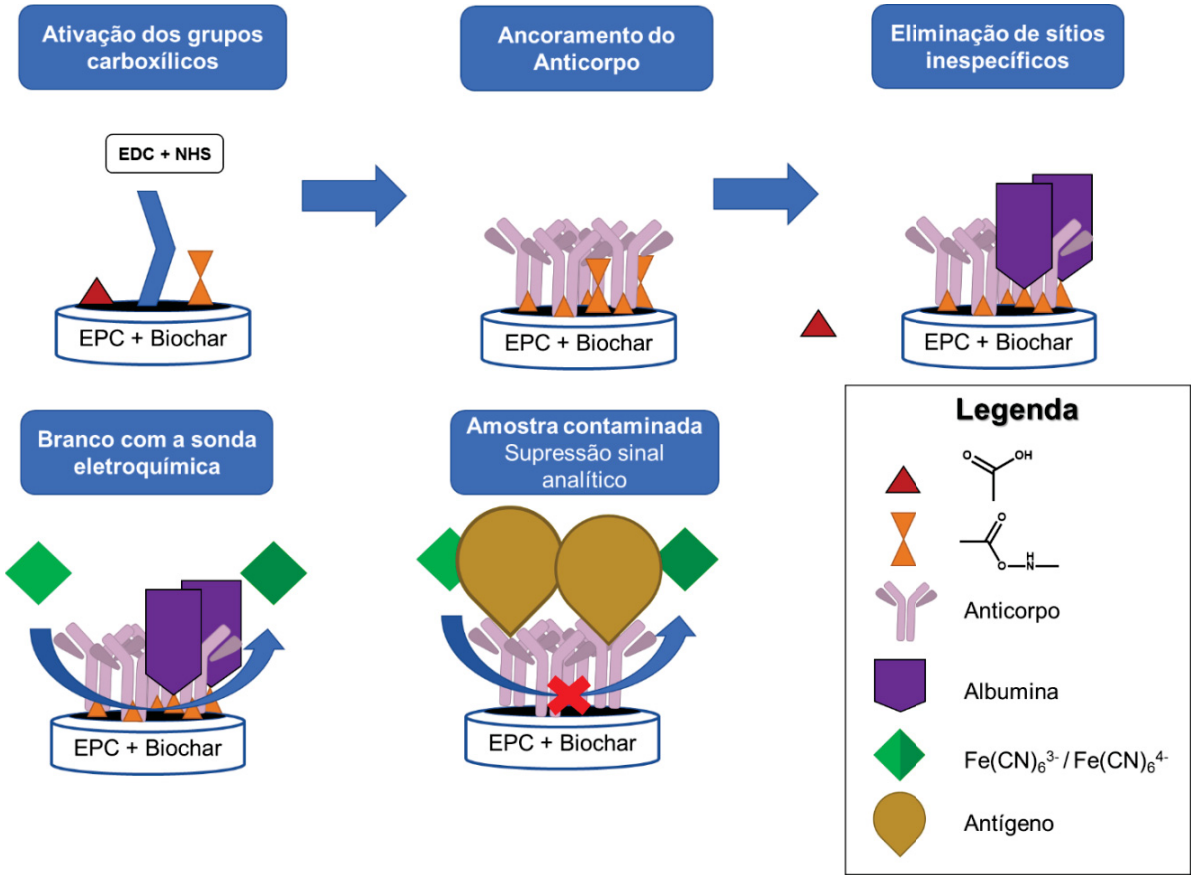
FIGURA 20: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM BIOCHAR TRATADOUTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L-1, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s-1 E ELETRÓLITO SUPORTE KNO3 0,1 mol L-1 EM pH 3,0.



Após a etapa de ativação da superfície do biochar com EDC e NHS, os grupos carboxílicos presentes apresentam-se, possivelmente, ativados com grupos Sulfo-NHS éster. É reportado por Pauliukaite, R.[71] que a ativação superficial com

EDC + Sulfo-NHS intensifica processos redox da sonda $Fe(CN)_6^{3-}$, uma vez que facilita processos de transferência de elétrons. Tal efeito podetambém ser observado no voltamograma, FIGURA 20 – EPCMB – EDC/NHS, ao comparar o perfil de resposta para os processos redox do $Fe(CN)_6^{3-}$ para o eletrodo contendo apenas biochar (EPCMB), com o perfil após a ativação superficial, EPCMB – EDC/NHS. Embora a melhora na resposta voltamétrica seja nítida, a caracterização da etapa de ativação da superfície eletródica com EDC e NHS é irrelevante, uma vez que estas moléculas servem somente de ponte para a incorporação do material biológico. O processo de construção e transdução do imunossensor proposto é melhor elucidado na FIGURA 21.

FIGURA 21: ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE CONTRUÇÃO E TRANSDUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO.



Fonte: O autor.

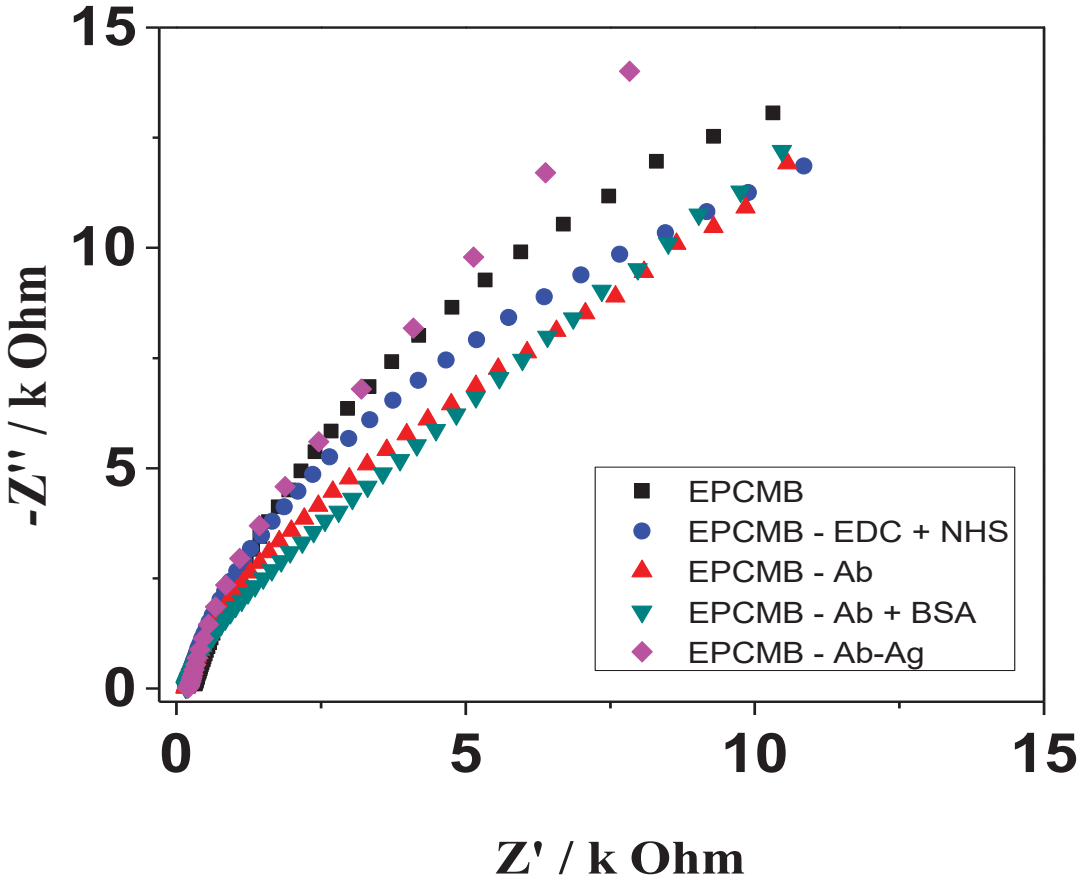
Após a ativação dos grupos carboxílicos, é realizada a imobilização do anticorpo contra o *hantavírus araucária*, feita a partir da técnica de *dropcasting,* utilizando 5,0 µL da solução estoque 0,4 mg mL^{-1}. É reportado em literatura [72], que a superfície do anticorpo apresenta densidade de carga positiva; como trata-

se de uma reação de substituição (ligação cruzada), o anticorpo se liga diretamente aos grupos carboxílicos do biochar, e por consequência é observado um aumento, Figura 20 – EPCMB – Ab, da intensidade de pico do ferricianeto de potássio, que pode ser atribuído a interação eletrostática da superfície positiva do anticorpo, com a sonda $Fe(CN)_6^{3-}$, negativa.

Para garantir que não restem sítios ativados na superfície do eletrodo, ou seja, sítios não ocupados pelo anticorpo imobilizado que restaram da reação com EDC e NHS, é realizado o ancoramento da albumina, que irá ocupar os sítios de ligação inespecífica. Para isso, 5,0 µL de uma solução de albumina (BSA) 1,0 mg mL^{-1}, em tampão fosfato 0,02 mol L^{-1} e pH 7.4 – condição que favorece a reação de substituição e consequente ancoramento da albumina [65,66], foi adicionada a superfície do eletrodo por *dropcasting.* Observou-se no voltamograma, Figura 21 – EPCMB – BSA, então uma diminuição da intensidade de pico quando comparado ao sinal obtido para o anticorpo,que pode ser atribuído ao bloqueio da superfície remanescente de biochar ativado com EDC e NHS, bem como adsorção do BSA na superfície do grafite, a qual é o único componente eletroativo no eletrodo[73].

Por fim, verificou-se a interação do antígeno com o anticorpo. O antígeno foi adicionado a superfície do eletrodo, também por *dropcasting,* utilizando 5,0 µL de uma solução 1,0 µg mL^{-1}. A partir do voltamograma obtido, Figura 21 – EPCMB – Ab-Ag, pode-se observar a diminuição da intensidade de pico referente aos processos redox do $[Fe(CN)_6]^{3-}$, que pode estar relacionado fundamentalmente por dois fatores já bastante difundidos na literatura [74–76]. O primeiro deles parte da idéia que a superfície do eletrodo apresenta carga positiva[71]; a interação do antígeno com o anticorpo possivelmente bloqueia sítios carregados positivamente na superfície do eletrodo e como consequência a interação entre a sonda eletroquímica e a superfície do eletrodo, de caráter eletrostático, diminui.Outro fator pode estar relacionado a formação do complexo antígeno-anticorpo, que por ser macromolecular pode dificultar a difusão das espécies até a superfície do eletrodo. Ainda existe a possibilidade de o antígeno estar bloqueando sítios eletroativos, adsorvendo-se no grafite e comprometendo também a interação da sonda com a superfície do eletrodo.A confirmação do processo de caracterização do dispositivo proposto foi realizada por EIS, representada na FIGURA 22.

FIGURA 22: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR.

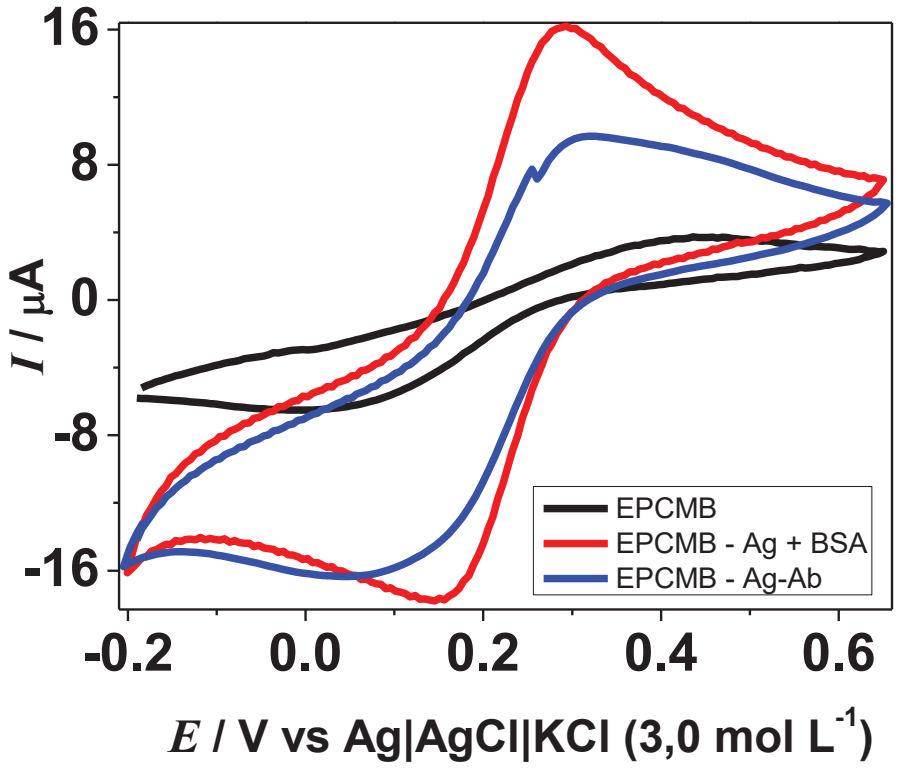


A partir dos dados obtidos por EIS, foi possível construir o plot dos diagramas de Nyquist (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**22) obtidos para os e letrodos construídos com as mesmas etapas descritas anteriormente. A partir do diagrama é possível verificar o mesmo padrão de perfil obtido na voltametria cíclica, para a EIS. Sendo que o semicírculo formado para o eletrodo sem modificação é ligeiramente maior, o que indica uma maior resistência a transferência de elétrons, 34,4 kΩ, provavelmente atrelado ao fato do modificador, biochar, apresentar baixa condutividade elétrica. Após a etapa de ativação dos grupos carboxílicos da superfície do biochar, com EDC / NHS, observa-se uma diminuição do semicírculo formado, que indica diminuição da resistência a transferência de elétrons, 26,5 kΩ, análogo ao observado por voltametria cíclica. A imobilização do anticorpo, por sua vez, mostrou também uma diminuição do raio do semicírculo, que indica maior taxa de transferência de elétrons entre o dispositivo e a sonda, 5,5 kΩ, possivelmente atrelado a um efeito eletrostático entre a superfície do anticorpo, que apresenta

densidade de carga positiva, e a sonda negativa. A BSA por sua vez não mostrou diferença significativa, 6,2 kΩ, possivelmente devido à quantidade ínfima de ligações realizadas, uma vez que só se liga a sítios inespecíficos vacantes após a imobilização do anticorpo. Por fim, a verificação da interação antígeno-anticorpo mostrou um acréscimo de resistência, atrelado a um maior bloqueio da superfície, além disso devido a neutralização de cargas da superfície do anticorpo 17,1 kΩ.

O segundo dispositivo proposto, o qual consiste na imobilização do antígeno para detecção do anticorpo, foi também caracterizado pelas técnicas de voltametria cíclica e EIS, como mostrado na FIGURA 23.

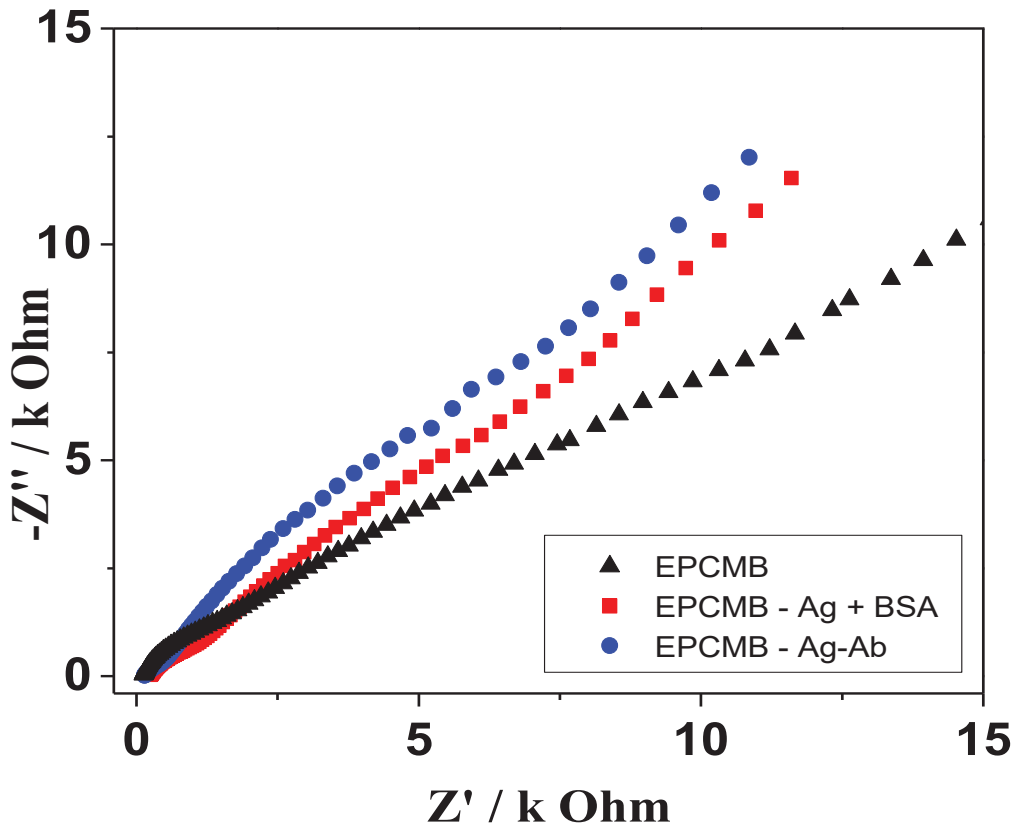
FIGURA 23: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM BIOCHAR TRATADO UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO3 0,1 mol L^{-1} EM pH 3,0.



Neste caso as etapas referentes ao EDC / NHS e BSA foram suprimidas, uma vez que já foram descritos no estudo anterior. A partir da análise dos dados obtidos por voltametria cíclica observa-se maior intensidade dos processos redox da sonda após a imobilização do antígeno (nucleoproteína), voltamograma vermelho, na superfície do dispositivo, indicando que o processo de imobilização

aconteceu eficientemente. Posterior a isso foi realizada aetapa de verificação da interação antígeno-anticorpo, ou seja formação do imunocomplexo, representada no voltamograma em azul, no qual é possível observar diminuição da intensidade de pico da sonda, após a etapa de inserção do anticorpo, de 14,22μA após o processo de imobilização do antígeno para 8,43 μA, indicando bloqueio da superfície eletroativa e interação efetiva das duas biomoléculas. A confirmação das etapas de imobilização foi realizada via EIS, representado na FIGURA 24.

FIGURA 24: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR.

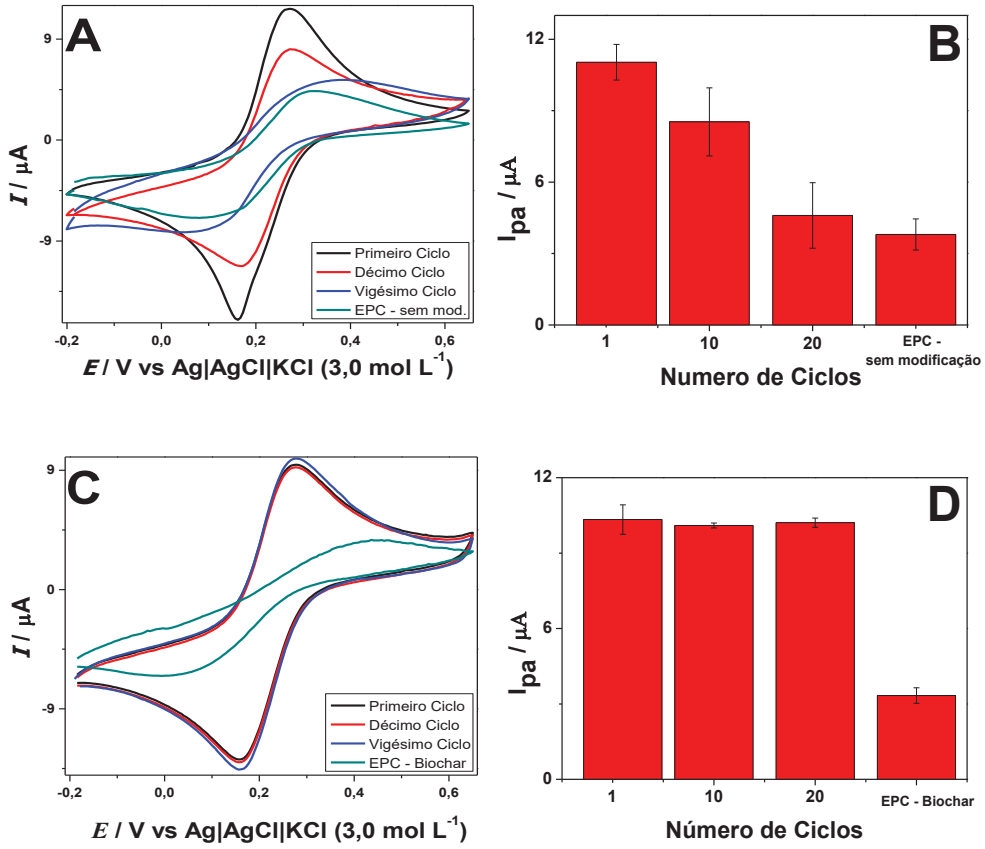


Após a etapa de imobilização do antígeno (nucleoproteína) observa-se uma diminuição no semicírculo formado, em vermelho, quando comparado ao eletrodo sem modificação, em preto, indicando uma diminuição na resistência a transferência de elétrons, resposta análoga ao obtido por voltametria cíclica, 33,1 kΩ branco – 16,2 kΩ antígeno, confirmando o processo de imobilização. Foi então realizada a etapa de verificação da interação do anticorpo com o dispositivo, ou

seja, formação do imunocomplexo. Observa-se então um aumento no semicírculo formado, que relaciona-se com a resistência a transferência de elétrons, 21,4 kΩ, efeito que está atrelado a um maior bloqueio da superfície eletroativa, devido ao macrocomplexo biológico formado.

Para fins de comparação, construiu-se um dispositivo EPC, sem o biochar, para verificar se o processo de ancoramento do material protéico depende de interações com o biocarvão. Este dispositivo foi então caracterizado também por voltametria cíclica, nas mesmas condições do EPCM com biochar tratado. As medidas de voltametria cíclica realizadas podem ser observadas na FIGURA 25.

FIGURA 25: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CICLOS CONSECUTIVOS DO EPC APÓS PROCESSO DE ANCORAMENTO – ANTICORPO E BSA (B) GRAFICOS DE BARRA CONSTRUIDOS PARA DIFERENTES CICLOS VOLTAMÉTRICOS. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV.



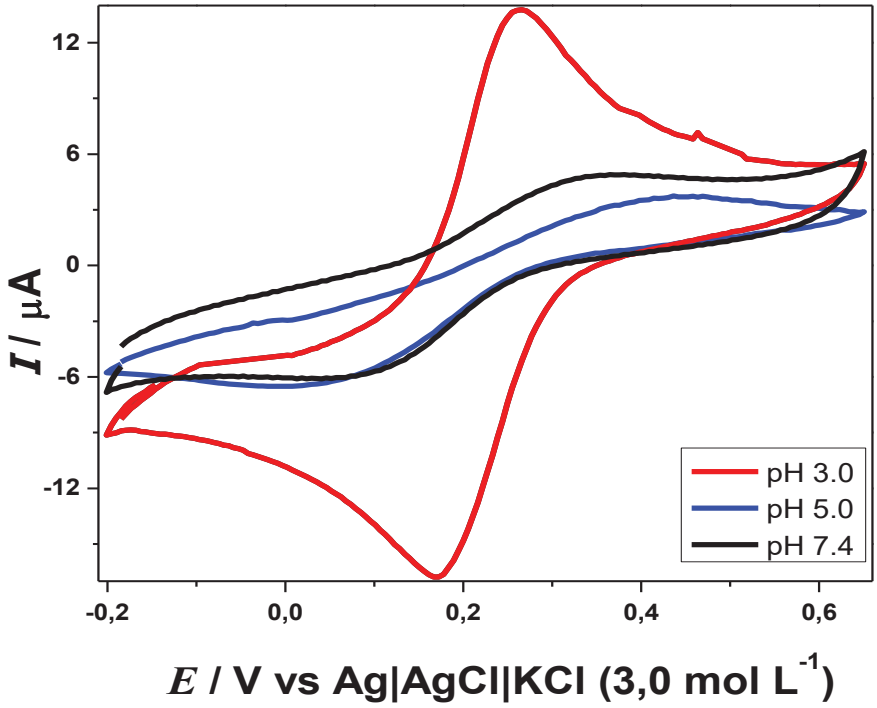
O dispositivo construído em 26A representa EPC após etapas de ancoramento do anticorpo e albumina. Após ciclos consecutivos desse mesmo eletrodo percebe-se uma diminuição da intensidade dos processos redox referentes

ao ferricianeto, possivelmente relacionado a lixiviação do material biológico na superfície e perda dessa característica positiva do EPC. Este processo pode ser comprovado pelo restabelecimento da corrente de pico para 4,2 µA após o 20º ciclo, praticamente a corrente de pico do eletrodo sem ancoramento, 3,9 µA. O mesmo estudo foi realizado empregando biochar (25 C), observa-se que após a imobilização das biomoléculas, mesmo realizando inúmeros ciclos, o processo redox não se altera significativamente, indicando estabilidade do ancoramento superficial, com uma diferença significativa entre o EPCM branco e EPCM ancorado com anticorpo, 3,6 µA passando a 10,1 µA e mantendo-se constante em todo o estudo de estabilidade.

4.5 CARACTERIZAÇÕES E OTIMIZAÇÕES VOLTAMÉTRICAS

Uma vez que, segundo a literatura [71], a superfície do anticorpo apresenta-se com densidade de carga positiva, optou-se por estudar a influência do pH na resposta eletroquímica do EPCM com biochar com anticorpo imobilizado. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão representados na FIGURA 26.

FIGURA 26: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO DE LEITURA. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} .



A partir dos dados obtidos pela técnica de voltametria cíclica, percebe-se inicialmente que para valores de pH 5,0 e 7,4 o eletrodo apresenta resposta voltamétrica deficiente para a sonda $Fe(CN)_6^{3-}$, que pode estar atrelado a neutralização das cargas positivas da superfície do anticorpo, fator que afetaria interações eletrostáticas com a sonda, que apresenta carga negativa. Isso acontece possivelmente devido ao valor de pKa_2 de grupos $-NH_3^+$ em estruturas protéicas, que tem valor em torno de 9,6, atrelado ao potencial isoelétrico que em proteínas apresenta valor médio de 5,5. Nos valores de pH estudados, 5,0 e 7,4 especula-se que os aminoácidos da estrutura protéica apresentam características Zwitterion, $COO^-–CH_2–NH_3^+$, efeito comumente encontrado em biomoléculas, segundo a literatura[77]. Por outro lado, em pH 3,0 ocorre provavelmente a protonação dos grupos aniônicos – COOH (pKa_1 ~2,2), tornando a biomolécula quimicamente neutra $COOH–CH_2– NH_2$.

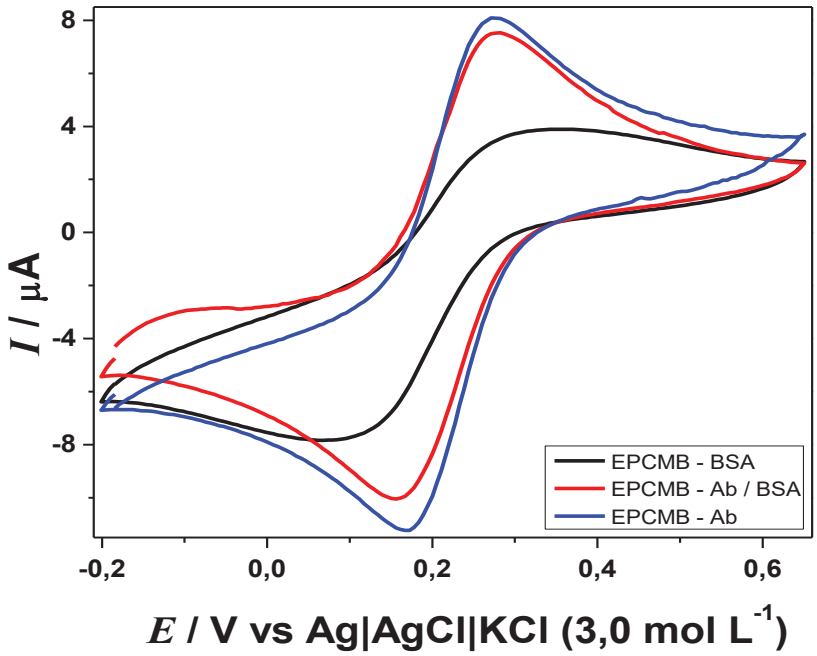
Ainda, especula-se que os ácidos carboxílicos superficiais do biochar apresentam-se majoritariamente modificados com os anticorpos ancorados, sendo assim qualquer contribuição atrelada a carga do biocarvão seria minoritária para a resposta voltamétrica encontrada.

Por outro lado,na resposta voltamétrica obtida em pH 3,0, a sonda exibe perfil bem definido, que pode estar relacionado com a carga superficial do anticorpo - nesta condição de pH estaria positiva. Também é reportado em literatura que condições ácidas favorecem processos redox do $Fe(CN)_6^{3-}$[78]. A carga superficial do anticorpo ainda necessita de investigação, que será realizada pela utilização de diferentes sondas, como $Ru(NH_3)_6^{3+}$, a fim de verificar a influência da carga da sonda na superfície do eletrodo. Tendo em vista o perfil obtido em pH 3,0 para o anticorpo, visto que seu sinal será definido como branco e espera-se a inibição deste sinal decorrente da interação do anticorpo com o antígeno, este valor será utilizado para medidas posteriores.

Após o processo de ancoramento do anticorpo na superfície do biochar, existe a possibilidade de ainda restarem sítios de ligação, ou seja, residuais de EDC e NHS na superfície do biochar; estes sítios apresentam possibilidade de ligação inespecífica, interagindo com qualquer biomolécula. A fim de minimizar essa interação inespecífica e assim garantir que a interação superficial ocorra majoritariamente devido a formação do complexo antígeno-anticorpo, utiliza-se a albumina, a qual se liga aos sítios restantes de EDC e NHS mas não se liga à outras

biomoléculas. Sendo assim, foi realizado um estudo para avaliar a influência da albumina na resposta do imunossensor, bem como a eficácia de sua ligação à sítios inespecíficos. Os resultados obtidos podem ser observados nos voltamogramas da FIGURA 27.

FIGURA 27: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ANCORAMENTO DA ALBUMINA. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0.

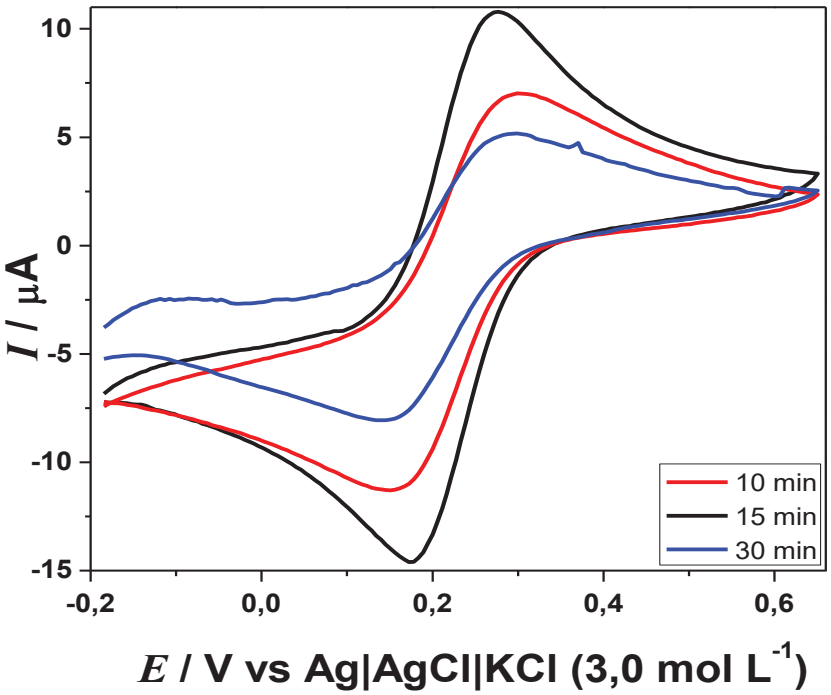


O teste referente somente a albumina, representado pelo voltamograma em preto, consiste na ativação do EPCM com biochar utilizando EDC e NHS seguido da imobilização somente da albumina na superfície do eletrodo. A partir disso, observa-se na Figura 27 – EPCM – BSA, que a albumina interfere significativamente nos processos redox referentes ao $[Fe(CN)_6]^{3-}$, provavelmente por bloquear a superfície eletródica a partir de interações com o biochar ou com o próprio grafite [79,80].Entretanto, em uma comparação entre um EPCM com biochar e anticorpo imobilizado (voltamograma em azul) e outro contendo anticorpo e albumina (voltamograma em vermelho), observa-se que não há variação significativa do sinal. Tal fato sugere que a superfície do eletrodo foi totalmente modificada com o anticorpo, por isso não se observa variação entre o anticorpo e a adição de albumina [48].

No que se refere a otimização da reação do biochar com os agentes de ligação cruzada, somente o tempo é uma variável relevante, uma vez que se utiliza

concentrações em excesso dos reagentes, 5,0 mmol L^{-1}, para garantir que toda a superfície do biochar seja ativada. Os estudos referentes às medidas de tempo de reação podem ser observados na FIGURA 28.

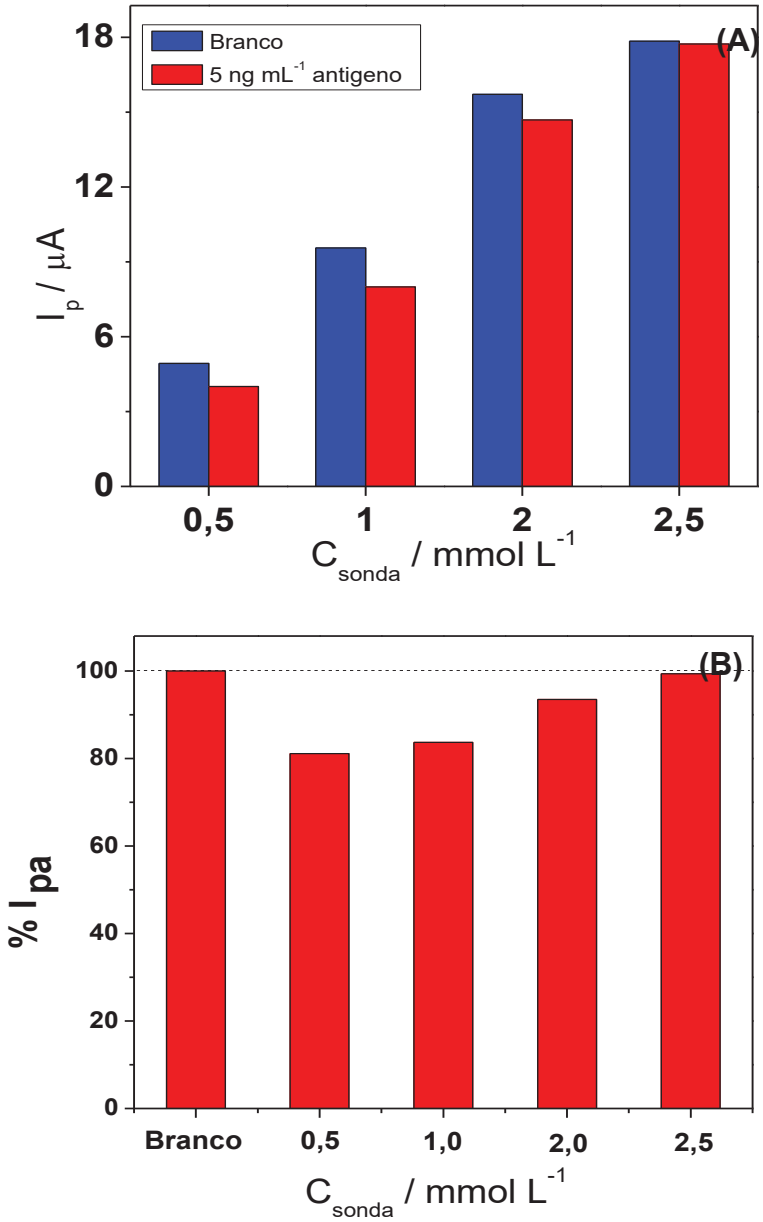
FIGURA 28: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO DA SUPERFICIE DO EPC COM BIOCHAR E OS AGENTES ATIVADORES. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0.



Foi observado, no voltamograma FIGURA 28, que tempos reacionais inferiores a 15 minutos não promovem ativação eficiente de ácidos carboxílicos, atrelado provavelmente a sítios carboxílicos ainda livres. Ainda, tempos superiores a 15 minutos promovem passivação da superfície do eletrodo, possivelmente devido a reações de auto-condensação dos reagentes EDC e NHS, na qual grupos carbonila podem agir como eletrófilo e nucleófilo ou hidrolise dos componentes[81]. Com base nisso, e no apresentado pelo voltamograma da FIGURA 28, o tempo de 15 minutos foi utilizado para medidas posteriores, como condição otimizada.

Tendo em vista que o dispositivo proposto consiste em uma detecção *label-free,* por inibição do sinal da sonda eletroquímica $K_3[Fe(CN)_6]$, se faz necessário verificar a influência da concentração da sonda na resposta do dispositivo. Para isso variou-se a concentração de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ na faixa de 0,5 a 2,5 mmol L^{-1}, a fim de se obter a maior faixa linear possivel, sem perder o limite de quantificação (5,0 ng mL^{-1}). Os resultados do estudo realizado são demonstrados na FIGURA 29.

FIGURA 29: (A) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUIDOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $K_3[Fe(CN)_6]$. (B) GRÁFICO DE BARRAS DE RELAÇÃO PORCENTAGEMDO BRANCO (100%) E VARIAÇÃO DA SONDA.

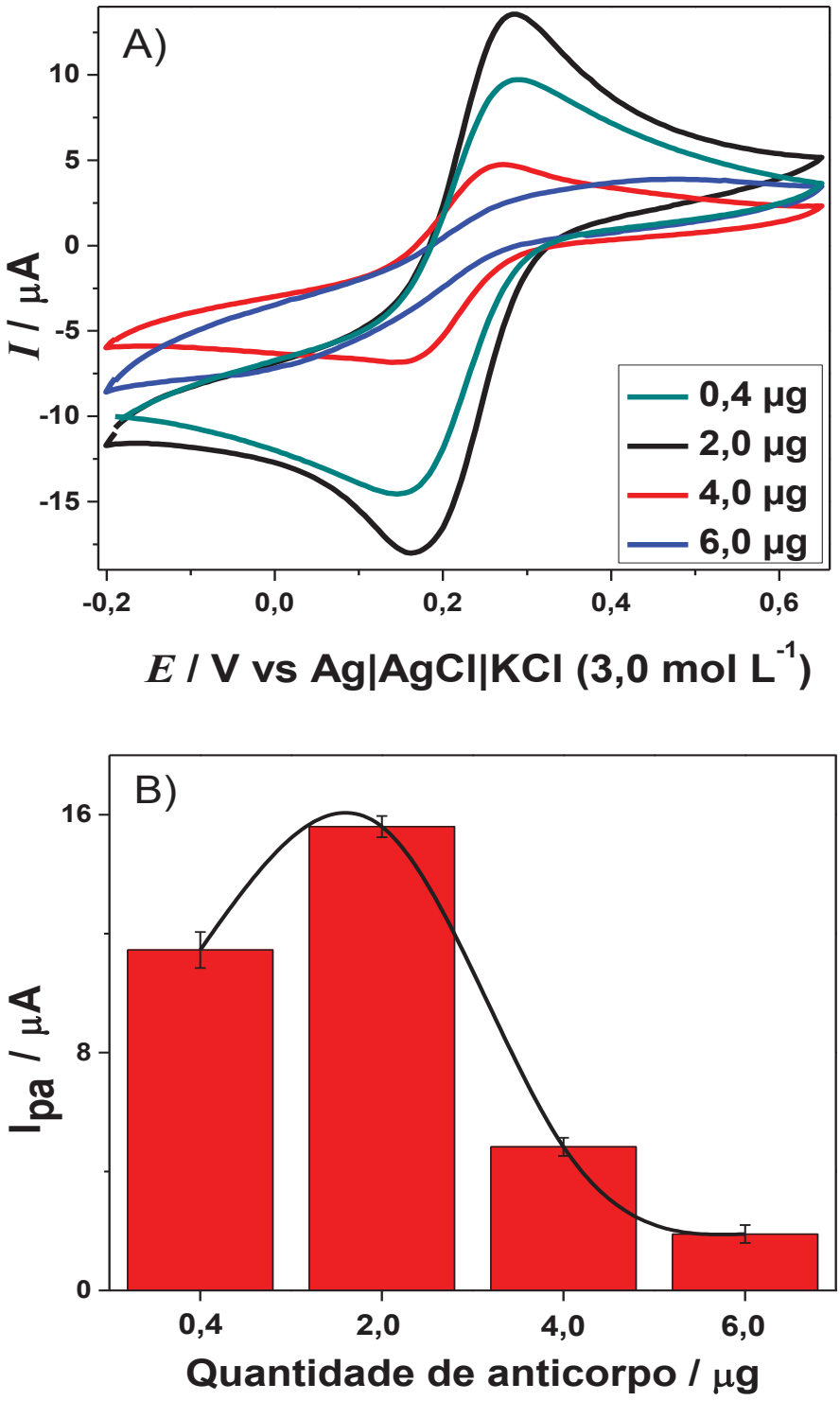


Os dispositivos utilizados neste estudo consistem em EPCMB com todas as etapas de ancoramento: ativados, com o anticorpo e albumina em sua superfície e posterior adição de 5,0 ng mL^{-1} de antígeno, concentração mínima requerida para o diagnóstico da hantavirose. A partir do gráfico de barras apresentado na FIGURA 29, é possível observar que para a faixa de concentração estudada de 0,5 a 2,5 mmol L^{-1} de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ houve uma diminuição da inibição do sinal com o aumento da concentração da sonda. A resposta medida é proveniente da interação entre a sonda eletroquímica e o anticorpo imobilizado na superfície do eletrodo. Quando

parte do anticorpo interage de forma específica com o antígeno, a superfície do eletrodo é bloqueada e observa-se a diminuição do sinal referente aos processos redox do íon ferricianeto. Para concentrações mais elevadas de ferricianeto em solução, a inibição do sinal é pouco pronunciada, já que a disponibilidade da sonda é maior. Embora os resultados sejam satisfatórios com relação ao objetivo da proposta, estudos adicionais serão realizados para melhor compreendimento do processo referente à concentração do $[Fe(CN)_6]^{3-}$, bem como a avaliação de uma sonda eletroquímica com carga positiva como $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, para verificar se há inversão do perfil observado. Visando maior faixa linear e reprodutibilidade, estudos posteriores foram realizados com concentração de 2,0 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio.

A quantidade de anticorpo ancorados na superfície do dispositivo é, também, parâmetro fundamental na construção de imunossensores, uma vez que pequenas quantidades podem causar uma baixa sensibilidade do dispositivo. Por outro lado, grandes quantidades podem saturar o dispositivo e/ou lixiviar, desperdiçando o material biológico em questão. Então, um estudo foi realizado variando-se a quantidade de anticorpo imobilizado na superfície do eletrodo proposto, alterando a massa de anticorpo de 0,4 a 6,0 µg utilizado para modificação da superfície do eletrodo. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 30.

FIGURA 30: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS DIFERENTES QUANTIDADES DE ANTICORPO ANCORADO NA SUPERFÍCIE, E (B) CORRENTES DE PICO ANÓDIO; EM $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0, 50mV s^{-1}



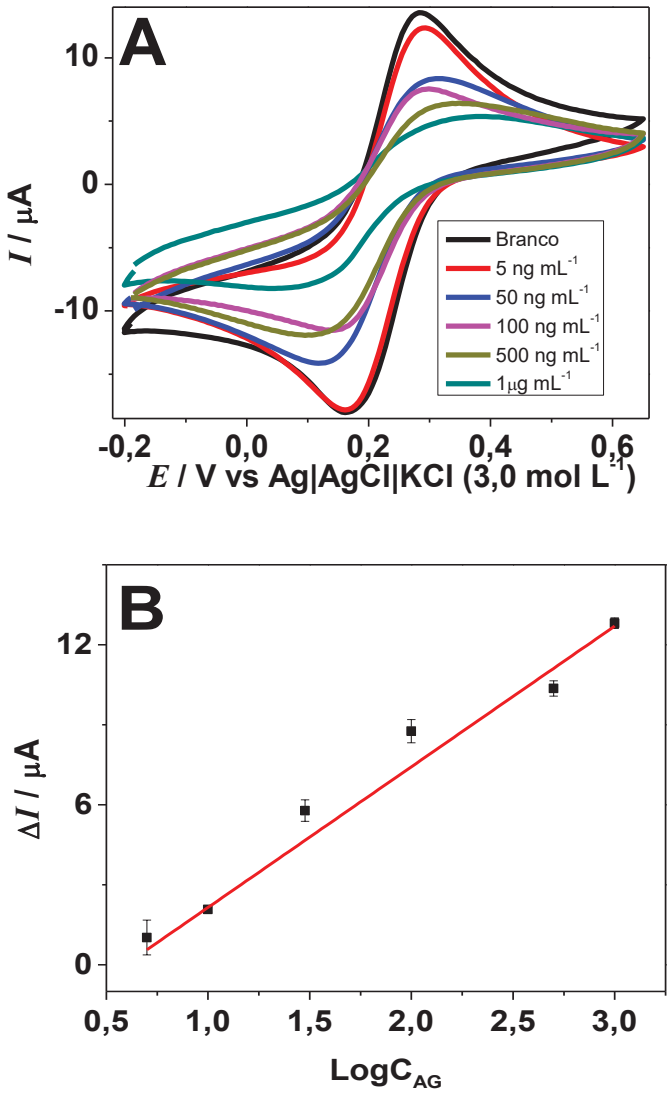
A partir dos voltamogramas (Figuras 30A e 30B) nota-se que um máximo de corrente é alcançado com 2,0 µg, e após isso um decréscimo é observado, sugerindo a saturação da superfície.Com base nos resultados obtidos, o valor de

2,0 µg foi escolhido como quantidade de anticorpo otimizado no sistema, o que é um indicio que a superfície não se apresenta envenenada e ainda mostra um possível ancoramento eficiente do anticorpo.

4.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Com todos os parâmetros pertinentes otimizados, construiu-se a curva analítica para quantificação do antígeno Hantavírus, utilizando dispositivo EPCMB - Ab, visando o diagnóstico de estágio viremico da doença, FIGURA 31.

FIGURA 31: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIGENO. (B) CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE CONCENTRAÇÃO ADICIONADA E INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0, (n = 3).

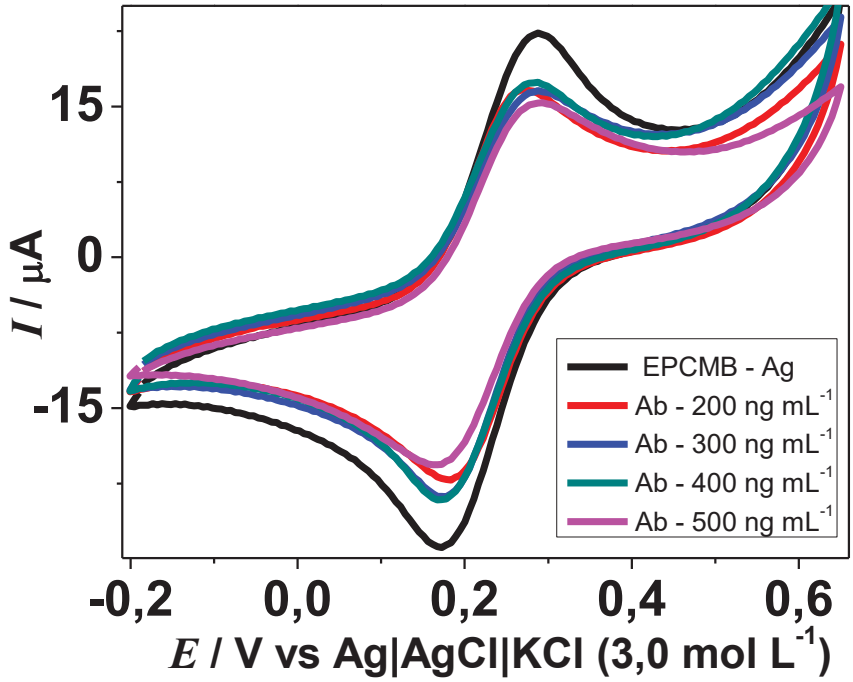


A construção da curva analítica consiste na adição de diferentes quantidades de antígeno na superfície de diferentes imunossensores. A formação do complexo biológico, como já mencionado, prejudica os processos redox da sonda; sendo assim, o aumento da quantidade de antígeno na superfície do dispositivo corrobora com a diminuição do sinal da sonda, como pode ser observado na FIGURA 31A, sendo o branco o dispositivo EPCM biochar com ancoramento do anticorpo e albumina. É possível perceber que a partir da primeira adição de antígeno, 5,0 ng mL^{-1}, há um decréscimo mensurável de intensidade de pico do processo anódico da sonda, e assim sucessivamente até o limite de saturação de 1,0µg mL^{-1}. Para cada ponto da curva foram confeccionados três eletrodos. Cada dispositivo só permite a realização de uma medida, uma vez que a formação do complexo biológico é irreversível, então adições sucessivas de antígeno, em um mesmo dispositivo, não resultam em variações de corrente.

O dispositivo demonstrou correlação linear com uma sensibilidade de 5,28 µA dec^{-1}, entre o logaritmo da concentração de antígeno e intensidade de pico anódico, em adições de 5,0 µL de soluções de concentração de 5,0 ng mL^{-1} a 1,0 µg mL^{-1}, pelo método de *dropcasting.* A finalidade do dispositivo é o diagnóstico da fase viremica da doença e este se mostra responsivo em ampla faixa, sendo observada concentração máxima mensurável de 1,0µg mL^{-1} do antígeno. Concentrações superiores a esta ainda são úteis, atuando como dispositivo do tipo qualitativo para a presença do antígeno [82–84].

O segundo dispositivo proposto, que visa detecção dos anticorpos contra o hantavírus apresentou resposta qualitativa, representada na FIGURA 32.

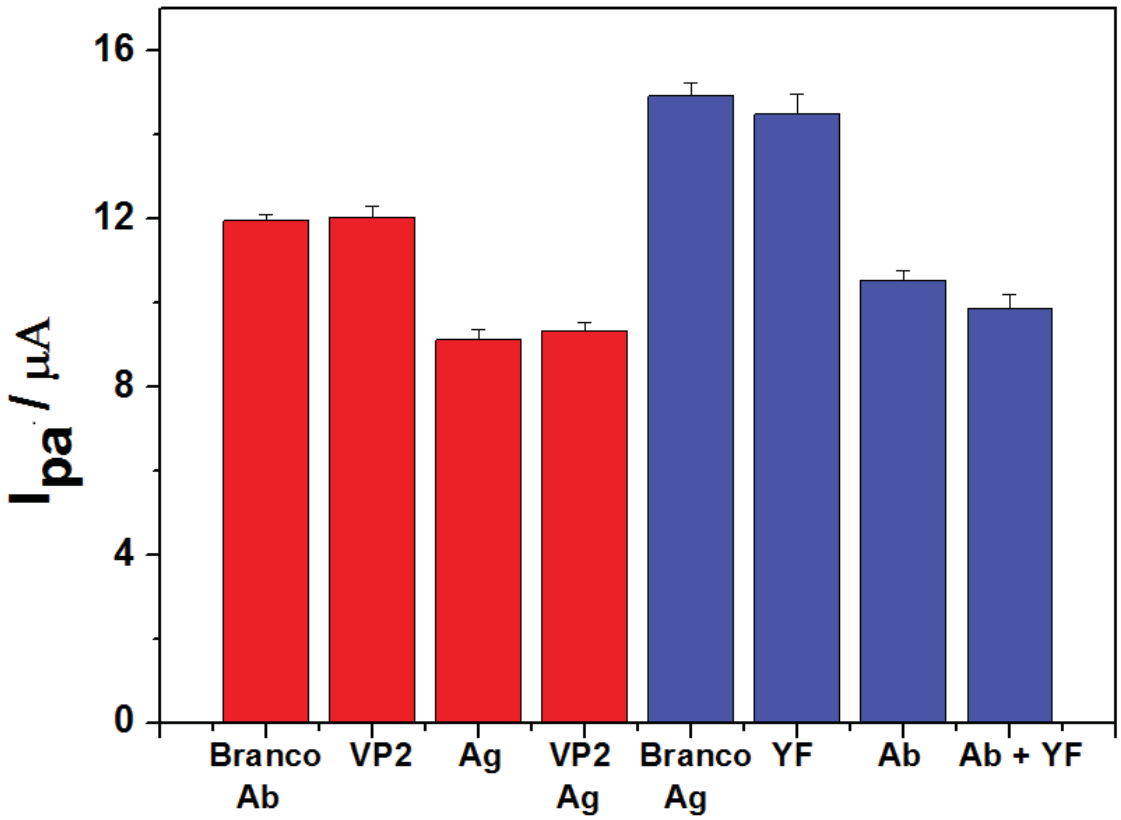
FIGURA 32: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPO. UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0,.



A detecção dos anticorpos contra hantavírus, apresentou resposta acima da concentração de 200 ng mL^{-1} do anticorpo, entretanto adições de concentração superior a essa concentração não mostraram alteração significativa da resposta obtida. Sendo que a variação do branco para as adições de anticorpo se repetem ao longo das triplicatas, o branco apresenta intensidade de pico de 23,83 µA e após a formação do imunocomplexo, devido a interação com o anticorpo observa-se diminuição para 16, 58 µA, Δi de 7,25µA. Apesar disso, o dispositivo ainda apresenta-se com a possibilidade de aplicação qualitativa.

Por fim, a seletividade dos dispositivos foi avaliada utilizando-se a proteína viral VP2 da doença de Gumboro, proteína proveniente do mesmo sistema de expressão, procariótico do hantavírus e também o anticorpo contra febre amerela (YF). Para isso, foi utilizado solução estoque 0,316 mg mL^{-1}, da proteína VP2 da doença de Gumboro e solução estoque de 0,160 mg mL^{-1} do anticorpo contra amarelão, em adições de 5,0µL por *dropcasting.* Os resultados obtidos estão expressos na FIGURA 33.

FIGURA 33: GRÁFICOS DE BARRA DE AVALIAÇÃO DO INTERFERENTE.



Na FIGURA 33, a região em vermelho representa o sinal do branco analítico, sendo este o dispositivo EPCM com biochar com ancoramento do anticorpo e da albumina, e posterior teste de seletividade, que consiste no *dropcasting* de 5,0 µL da proteína VP2 (interferente). Neste caso, não foram observadas variações significativas entre o sinal de branco e a medida após a adição do interferente, possivelmente devido à proteína VP2 não interagir eficientemente com o anticorpo contra Hantavírus. Foi então realizada a verificação de 10,0 ng mL^{-1} do antígeno Hantavírus (Ag) e posterior ensaio competitivo das duas proteínas. Pode-se observar que também não há variação significativa entre o sinal proveniente do hantavírus (Ag) e a mistura do Ag com o interferente (VP2). Evidenciando boa seletividade do dispositivo frente a esta proteína.

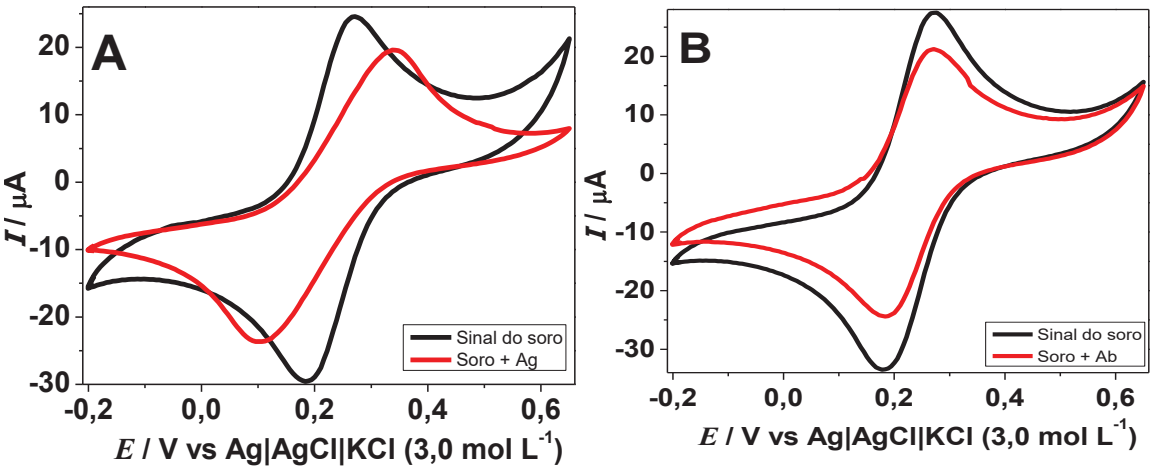
Em azul é representado o teste de seletividade para o dispositivo com imobilização do antígeno, que consiste no *dropcasting* de 5,0 µL do anticorpo contra febre amarela (YF - interferente). Não observa-se diferença significativa entre o branco desse dispositivo e a medida após a inserção do anticorpo YF, devido ao anticorpo, YF, não interagir com a nucleoproteina do hantavirus, foi então realizada

uma medida de 200 ng mL^{-1} de anticorpo contra o hantavirus e uma mistura de anticorpos, hantavirus e YF, sendo que não se observa diferença significativa entre a mistura e a medida realizada somente com o anticorpo contra hantavirus, indicando que seletividade do dispositivo frente ao anticorpo contra febre amarela.

4.7 APLICAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES EM AMOSTRA REAL

A aplicação do imunossensor foi feita utilizando soro humano comercial, composto por uma gama de proteínas em grande quantidade, sendo majoritariamente encontrada, e com maior potencial interferente na resposta a hemoglobina (IgM; 20 µg mL^{-1}). O soro foi utilizado com diluição 1:100 nos testes de amostras reais e fortificadas. O eletrodo foi incubado com o soro diluído e soro fortificado com antígeno ou anticorpo, as medidas de voltametria cíclica na presença de íons ferricianeto feitas depois de 30 minutos de incubação. Na figura 34 estão representados os voltamogramas obtidos para os testes de aplicação em amostra real.

FIGURA 34: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO E SORO FORTIFICADO COM ANTIGENO (AG) (B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO E SORO FORTIFICADO COM ANTICORPO (AB). UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L^{-1}, VELOCIDADE DE VARREDURA 50mV s^{-1} E ELETRÓLITO SUPORTE KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 3,0,.

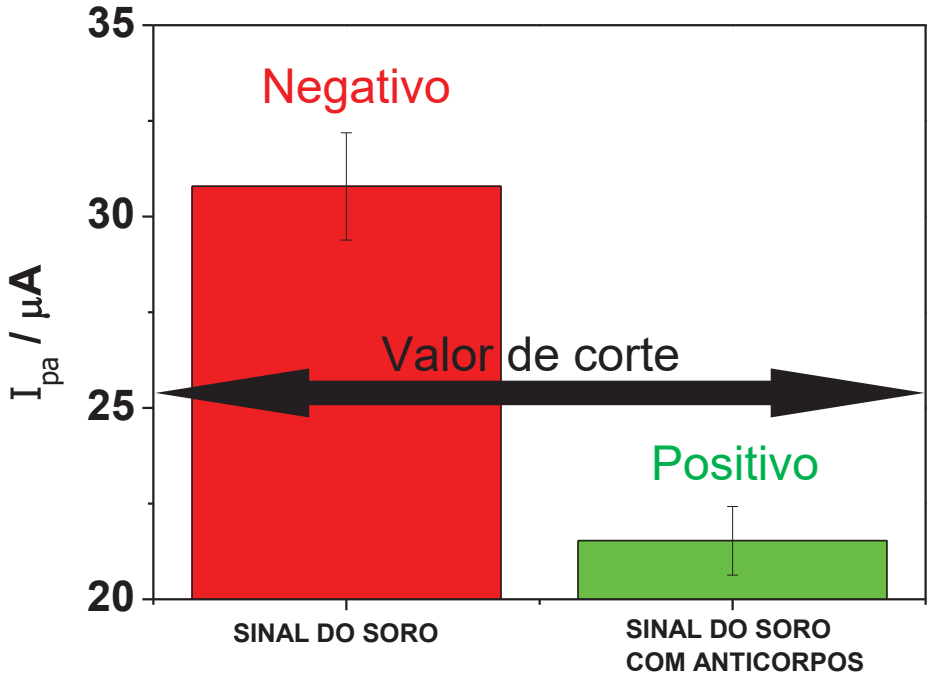


A detecção do antígeno, voltamograma 34A, consiste na utilização do dispositivo com anticorpo imobilizado, EPCMB - Ab, a amostra de soro foi fortificada

a fim de se obter concentração final de 100 ng mL^{-1} de antígeno. Observa-se a partir do voltamograma 34A uma diferença entre os sinais do soro e soro fortificado com antígeno, que pode ser atribuído as interações especificas do anticorpo com a nucleoproteína (Ag). As interações que ocorrem aumentam o bloqueio da superfície eletródica e geram a variação do sinal, sendo que o sinal obtido somente para o soro é referente a interação de anticorpos inespecíficos e interferentes com a superfície do dispositivo. Não foram avaliadas diferentes concentrações, entretanto o resultado obtido, Δi de 5,15 μA para concentração de 100 ng mL^{-1}, coincide com o obtido na curva analítica, a partir disso especula-se a possibilidade de aplicação do dispositivo para quantificação em amostras de soro.

A detecção do anticorpo, representado no voltamograma 34B, se utiliza do eletrodo com antígeno imobilizado, 200 ng mL^{-1}, análogo ao realizado em 34A, o soro foi fortificado com anticorpos contra hantavírus a fim de se obter concentração final de 200 ng mL^{-1}, e a diferença observada entre o sinal do soro e o soro fortificado se deve as interações especificas do antígeno, imobilizado, e o anticorpo em solução. A detecção, mesmo não quantitativa, apresenta o sinal para amostras positivas de forma reprodutível, o que viabiliza a aplicação do dispositivo em amostras reais. Neste caso, como trata-se de uma aplicação qualitativa pode-se estimar um valor de corte que indicaria a presença do agente patogênico, como mostrado na FIGURA 35.

Figura 35: APLICABILIDADE DO SENSOR QUALITATIVO.



Sendo assim, um valor de corte pode ser estipulado, e quando o sinal obtido é acima desse valor a amostra pode ser considerada positiva, uma vez que para ultrapassar o valor de corte é necessário a contribuição de interações antígeno-anticorpo específicas. Os sinais obtidos para o soro resumidos na FIGURA 35 tem uma média de 30,62 µA. Já para a incubação do soro com o anticorpo específico ocorre uma redução de 30% no valor do sinal.

Considerando a variação intrínseca da construção do imunossensor, um valor de corte de 15% de diminuição da corrente de pico pode ser utilizado para declarar uma amostra positiva ou negativa, pois é um valor que dificilmente será ultrapassado por amostras negativas. Dessa forma, o imunossensor proposto pode ser aplicado na detecção qualitativa de anticorpos contra o hantavirus, visando a possibilidade de aplicação como diagnostico da síndrome pulmonar por hantavírus.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação às caracterizações químicas e estruturais, as imagens de MEV evidenciaram que a síntese do biochar produziu um material de estrutura porosa e irregular, enquanto as medidas de FTIR confirmaram a produção de um material rico em grupos funcionais, sendo estes majoritariamente derivados de carbono: cetonas, carboxilatos, lactonas. A partir da interpretação das imagens obtidas por MEV em conjunto com os espectros de FTIR, pode-se especular sobre a estrutura superficial do biochar, que possibilitam o ancoramento protéico para construção do imunossensor, as quais foram confirmadas por método BET e titulação de Boehm.

As caracterizações eletroquímicas realizadas, via sonda Ferricianeto, permitiram verificar o ancoramento das proteínas na superfície do biochar, bem como possibilitou a detecção do antígeno. Ainda, as otimizações possibilitaram um ancoramento estável, com pequena interferência de agentes inibidores de sítios inespecíficos (albumina) e limites de quantificação e faixa linear satisfatórios. Ambos os dispositivos viabilizaram a detecção quantitativa para detecção do antígeno, e qualitativo para detecção dos anticorpos. Os testes de seletividade e amostra real mostraram boa seletividade dos dispositivos frente aos possíveis interferentes, antígeno da Gumboro, anticorpo da febre amarela, anticorpos presentes no soro sanguíneo.

Sendo assim, o dispositivo possibilita a detecção de Hantavirose em sua fase viremica quantitativamente, oferecendo a possibilidade da utilização como um imunossensor do tipo qualitativo e durante a fase sintomática como sensor qualitativo.

6 ETAPAS FUTURAS

O trabalho ainda apresenta como perspectivas a aplicação do dispositivo em amostras ambientais, analise de água pluvial e fluvial. E verificação de espécies de roedores silvestres. Bem como analise de amostras reais de soro humano, que ainda são inviabilizados devido aos protocolos de saúde e segurança.

7 REFERÊNCIAS

[1] Lawrence, C.M.; Menon, S.; et al. Structural and functional studies of archaeal viruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12599–12603, 2009.

[2] Koonin, E. V.; Senkevich, T.G.; et al. The ancient virus world and evolution of cells. **Biology Direct**, v. 1, p. 1–27, 2006.

[3] Nathan, A.J.; Scobell, A. **How China sees America**. 2012.

[4] Earn, D.J.D.; Dushoff, J.; et al. Ecology and evolution of the flu. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, n. 7, p. 334–340, 2002.

[5] Breitbart, M.; Rohwer, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278–284, 2005.

[6] David D. Chaplin Overview of the Immune Response. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 125, 2010.

[7] Sela-Culang, I.; Kunik, V.; et al. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. OCT, p. 1–13, 2013.

[8] Schmaljohn, C.; Hjelle, B. Hantaviruses: A Global Disease Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 95–104, 1997.

[9] Muyangwa, M.; Martynova, E. V.; et al. Hantaviral proteins: Structure, functions, and role in hantavirus infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

[10] Vaheri, A.; Strandin, T.; et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 539–550, 2013.

[11] Ho Wang Lee, L.J.B. and K.M. Isolation of Hantaan Virus , the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever , from Wild Urban Rats Published by : Oxford University Press Stable URL : http://www.jstor.org/stable/30112439 Isolation of Hantaan Virus , the Etiologic. v. 146, n. 5, p. 638–644, 2016.

SUS (2017). Situação epidemiológica do Hantavírus. 1.

[13] Raboni, S.M.; Levis, S.; et al. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 89–97, 2007.

[14] Pereira, S.S.; Moreira-Dill, L.S.; et al. Novel camelid antibody fragments targeting recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus: A prototype for an early diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2014.

[15] Colavecchia, S.B.; Edelstein, A.; et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. v. 49, n. 2000, p. 149–155, 2017.

[16] Ricci, F.; Adornetto, G.; et al. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.

[17] Loos, C.M. Van Der Multiple immunoenzyme staining: Methods and visualizations for the observation with spectral imaging. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 56, n. 4, p. 313–328, 2008.

[18] Watanabe, E.; Miyake, S.; et al. Review of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for analyses of neonicotinoid insecticides in agro-environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12459–12472, 2013.

[19] Mehrotra, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

[20] Draisci, R.; Volpe, G.; et al. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 225–232, 1998.

[21] Zhao, G.; Wang, H.; et al. Advances in biosensor-based instruments for pesticide residues rapid detection. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 12, p. 9790–9807, 2015.

[22] Abdalhai, M.H.; Fernandes, A.M.; et al. Electrochemical Genosensor to

Detect Pathogenic Bacteria (Escherichia coli O157:H7) As Applied in Real Food Samples (Fresh Beef) to Improve Food Safety and Quality Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 20, p. 5017–5025, 2015.

[23] Luppa, P.B.; Sokoll, L.J.; et al. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.

[24] Lim, S.A.; Ahmed, M.U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. **RSC Advances**, v. 6, n. 30, p. 24995–25014, 2016.

[25] He, P.; Wang, Z.; et al. Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 707–714, 2009.

[26] Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206–222, 1959.

[27] Barsoukov, E.; Macdonald, J.R. **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications**. 2005.

[28] Achterberg, E.P. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. 1996.

[29] Ricci, F.; Volpe, G.; et al. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, n. 2, p. 111–129, 2007.

[30] Taylor, P.; Švancara, I.; et al. Critical Reviews in Analytical Chemistry Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis Electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical chemistry**, v. 31, n. March 2012, p. 37–41, 2010.

[31] Grygar, T.; Marken, F.; et al. Electrochemical analysis of solids. A review. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 67, n. 2, p. 163–208, 2002.

[32] Motta, N.; Guadalupe, A.R. Activated Carbon Paste Electrodes for Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 566–571, 1994.

[33] Xu, G.; Lv, Y.; et al. Review Recent Advances in Biochar Applications in Agricultural Soils : Benefits and Environmental Implications. v. 00, n. 0, p. 1–6, 2012.

[34] Suguihiro, T.M.; Oliveira, P.R. de; et al. An electroanalytical approach for evaluation of biochar adsorption characteristics and its application for Lead and Cadmium determination. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 40–45, 2013.

[35] Gevaerd, A.; Oliveira, P.R. De; et al. Evaluation of antimony microparticles supported on biochar for application in the voltammetric determination of paraquat. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 123–129, 2016.

[36] Ahmad, M.; Rajapaksha, A.U.; et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19–33, 2014.

[37] Li, X.; Shen, Q.; et al. Functional Groups Determine Biochar Properties (pH and EC) as Studied by Two-Dimensional 13 C NMR Correlation Spectroscopy. v. 8, n. 6, 2013.

[38] Ivanov, A.N.; Lukachova, L. V.; et al. Polyaniline-modified cholinesterase sensor for pesticide determination. **Bioelectrochemistry**, v. 55, n. 1–2, p. 75–77, 2002.

[39] Guler, G.O.; Cakmak, Y.S.; et al. Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1218–1221, 2010.

[40] Fischer, C.; Fraiwan, A.; et al. A 3D paper-based enzymatic fuel cell for self-powered, low-cost glucose monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 193–197, 2016.

[41] Bahadir, E.B.; Sezgintürk, M.K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, n. October, p. 62–71, 2015.

[42] Rogers, K.R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1–2, p. 222–231, 2006.

[43] Arya, S.K.; Datta, M.; et al. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1083–1100, 2008.

[44] Marco, R. De; Clarke, G.; et al. Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis. **Electroanalysis**, v. 19, n. 19–20, p. 1987–2001, 2007.

[45] Macdonald, J.R. **Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications**. 2005.

[46] Marques, R.C.B.; Costa-Rama, E.; et al. Voltammetric immunosensor for the simultaneous analysis of the breast cancer biomarkers CA 15-3 and HER2-ECD. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 918–925, 2018.

[47] Roitt, I.; Brostoff, J.; et al. Immunology, 2nd Ed. **Gower Med. Publishing, London**, 1989.

[48] Li, X.P.; Ji, G.; et al. Selective laser melting of nano-TiB2decorated AlSi10Mg alloy with high fracture strength and ductility. **Acta Materialia**, v. 129, p. 183–193, 2017.

[49] Gomes-Filho, S.L.R.; Dias, A.C.M.S.; et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 10–15, 2013.

[50] Arya, S.K.; Solanki, P.R.; et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810–2817, 2009.

[51] Rezende, E.I.P.; Angelo, L.C.; et al. Artigo Biocarvão (Biochar) e Sequestro de Carbono Biochar & Carbon Sequestration Biocarvão (Biochar) e Sequestro de Carbono 2 . Algumas estratégias para a diminuição. v. 3, n. 5, p. 426–433, 2011.

[52] Mazzarotto, G.A.C.A.; Raboni, S.M.; et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 162, n. 1–2, p. 96–100, 2009.

[53] Boehm, H.P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. **Carbon**, v. 32, n. 5, p. 759–769, 1994.

[54] Estupiñan, P.R.; Giraldo, L.; et al. Oxidación de la superficie de carbón activado mediante HNO 3 y H 2O 2: Efecto sobre la remoción de níquel (II) en solución acuosa. **Revista Colombiana de Quimica**, v. 40, n. 3, p. 349–364, 2011.

[55] Yin, C.Y.; Aroua, M.K.; et al. Review of modifications of activated carbon for enhancing contaminant uptakes from aqueous solutions. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 403–415, 2007.

[56] Stavropoulos, G.G.; Samaras, P.; et al. Effect of activated carbons modification on porosity, surface structure and phenol adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 2–3, p. 414–421, 2008.

[57] Mohd, W.; Wan, A. Textural characteristics , surface chemistry and oxidation of activated carbon. **Journal of Natural Gas Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 267–279, 2010.

[58] Li, Y.; Shao, J.; et al. Characterization of Modi fi ed Biochars Derived from Bamboo Pyrolysis and Their Utilization for Target Component (Furfural) Adsorption. 2014.

[59] Sun, H.; Hockaday, W.C.; et al. Multiple controls on the chemical and physical structure of biochars. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 9, p. 3587–3597, 2012.

[60] Oleszczuk, P.; Jośko, I.; et al. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. **Geoderma**, v. 214–215, p. 10–18, 2014.

[61] Doumenq, P. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. v. 111, p. 205–214, 2011.

[62] Cantrell, K.B.; Hunt, P.G.; et al. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 419–428, 2012.

[63] Zukal, A.; Arean, C.O.; et al. Microporous and Mesoporous Materials Combined volumetric , infrared spectroscopic and theoretical investigation of CO 2 adsorption on Na-A zeolite. v. 146, p. 97–105, 2011.

[64] Fidel, R.B.; Laird, D.A.; et al. Evaluation of Modified Boehm Titration Methods for Use with Biochars. **Journal of Environmental Quality**, v. 42, n. 6, p. 1771–1778, 2013.

[65] Wang, C.; Yan, Q.; et al. Different EDC / NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. p. 12058–12068, 2011.

[66] Communication, S. Short Communication CE detection of N - (3-dimethylaminopropyl) - N -carbodiimide / N -hydroxysuccinimide- coupled proteins after homo- and hetero-crosslinking reactions. p. 1097–1100, 2010.

[67] Li, H.; Bapat, A.P.; et al. Protein conjugation of thermoresponsive amine-reactive polymers prepared by RAFT. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 323–327, 2011.

[68] https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html.

[69] Zaib, M.; Athar, M.M. Electrochemical evaluation of Phanerocheaete chrysosporium based carbon paste electrode with potassium ferricyanide redox system. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 8, p. 6690–6702, 2015.

[70] Oliveira, T.M.B.F.; Fátima Barroso, M.; et al. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. **Talanta**, v. 106, p. 137–143, 2013.

[71] Pauliukaite, R.; Ghica, M.E.; et al. Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 13, p. 5364–5372, 2009.

[72] Xu, X.; Severson, W.; et al. The RNA Binding Domain of the Hantaan Virus N Protein Maps to a Central, Conserved Region. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3301–3308, 2002.

[73] Ignat, T.; Miu, M.; et al. Electrochemical characterization of BSA/11-mercaptoundecanoic acid on Au electrode. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 169, n. 1–3, p. 55–61, 2010.

[74] Electrode, G. An Electrochemical Immunosensor for Detection of Staphylococcus aureus Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. n. Cv, p. 417–426, 2012.

[75] Yan, W.; Chen, X.; et al. Fabrication of a label-free electrochemical immunosensor of low-density lipoprotein. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 4, p. 1275–1281, 2008.

[76] Yi, Q.; Liu, Q.; et al. Application of an Electrochemical Immunosensor with a MWCNT/PDAA Modified Electrode for Detection of Serum Trypsin. p. 10203–10212, 2014.

[77] NELSON, D. L.; COX, M.L. **Princípios de Bioquímica**. 2002.

[78] Emad, M.M.R.; Tan, A.J.A.W.T. Electrochemical characterization of the redox couple of Fe (III)/ Fe (II) mediated by grafted polymer electrode. n. Iii, 2012.

[79] Piro, B.; Reisberg, S. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. 2017.

[80] Safety, F.; Security, P. Comparison of Electrochemical Immunosensors and Aptasensors for Detection of Small Organic Molecules in Environment , Food Safety , Clinical and. 2016.

[81] Totaro, K.A.; Liao, X.; et al. Systematic Investigation of EDC/sNHS-Mediated Bioconjugation Reactions for Carboxylated Peptide Substrates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 994–1004, 2016.

[82] Paulo, S.; De, D.; et al. Article / Artigo Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeir{ã}o. v. 43, n. 4, p. 348–354, 2010.

[83] Muranyi, W.; Bahr, U.; et al. Hantavirus infection. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 12, p. 3669–3679, 2005.

[84] Jonsson, C.B.; Figueiredo, L.T.M.; et al. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 412–441, 2010.