



Desenvolvimento de um Imunoensaio Eletroquímico para o Diagnóstico Precoce da Doença Renal Crónica

CATARINA MOREIRA RODRIGUES VARELA

julho de 2019

Desenvolvimento de um Imunoensaio Eletroquímico para o Diagnóstico Precoce da Doença Renal Crónica

Catarina Moreira Rodrigues Varela, 1141159

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, ramo opcional Qualidade

Orientação

Hendrikus Petrus Antonius Nouws

Marta Maria Pereira da Silva Neves

Centro de Investigação

Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ)

Julho 2019

Agradecimentos

Após a realização deste estágio, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e acompanharam durante este percurso.

Estou grata ao Doutor Hendrikus Nouws pela oportunidade de integrar este projeto, pela orientação, pela disponibilidade e por todo o apoio prestado durante a dissertação.

Agradeço à Doutora Marta Neves por todo o apoio prestado, pela orientação, pela disponibilidade e pela paciência.

Gostaria também de agradecer aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo e apoio durante a realização do trabalho.

Por fim, não poderia deixar de agradecer àqueles que estão sempre presentes, refiro-me de forma especial à minha família e amigos pelo apoio incondicional, pela paciência, pela motivação que me transmitiram e por estarem sempre presentes.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais (UID/QUI/50006/2019) e pela União Europeia através do projeto Norte-01-0145-FEDER-000024 (DESIGNBIOTecHealth - New Technologies for three Health Challenges of Modern Societies: Diabetes, Drug Abuse and Kidney Diseases), cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) no âmbito da parceria CCDR-N - NORTE2020.

Resumo

A doença renal crónica, cuja incidência tem vindo a aumentar, caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível da função dos rins. É uma patologia que nos estádios iniciais é silenciosa e assintomática, pelo que o diagnóstico ocorre, normalmente, em estádios avançados, o que compromete o tratamento e a qualidade de vida do paciente. Apesar de já existirem metodologias de diagnóstico precoce, baseadas na análise de biomarcadores desta doença, estas são demoradas, dispendiosas e requerem equipamentos sofisticados e técnicos qualificados. Assim, espera-se que o desenvolvimento de estratégias analíticas alternativas que simplifiquem a metodologia de análise contribua significativamente para a diagnóstico precoce desta doença. Neste sentido, no presente trabalho propôs-se o desenvolvimento de um imunoensaio eletroquímico para o diagnóstico precoce da doença renal crónica, através da deteção da cistatina C. A estratégia sensora estudada combinou a versatilidade e baixo custo dos eléctrodos serigrafados com a elevada seletividade de um imunoensaio de tipo “sanduíche”, no qual se utilizaram partículas magnéticas para a imobilização do anticorpo de captura. A interação entre o anticorpo de deteção e o analito, foi identificada recorrendo a uma marca enzimática (fosfatase alcalina) e à deteção eletroquímica de um dos produtos da reação correspondente. Após a otimização das condições experimentais, a resposta do imunoensaio a concentrações crescentes do analito em estudo demonstrou ser linear entre 5 ng/mL e 25 ng/mL de cistatina C, tendo-se obtido um limite de deteção de 2,1 ng/mL. No âmbito deste trabalho foram, também, analisadas com sucesso amostras reais de pacientes com doença renal crónica, o que comprovou que com a metodologia desenvolvida foi possível detetar este biomarcador nos estádios iniciais da patologia com uma exatidão aceitável. O ensaio desenvolvido forneceu resultados altamente precisos (coeficiente de variação inferior a 10%) num tempo de análise total inferior a 4 horas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o imunoensaio proposto poderá, no futuro, contribuir para o diagnóstico precoce e descentralizado da doença renal crónica.

Palavras-chave: imunoensaio eletroquímico, biomarcador, cistatina C, doença renal crónica, partículas magnéticas, eléctrodos serigrafados.

Abstract

Chronic kidney disease, which incidence has been increasing, is characterized by the progressive and irreversible decline of kidney function. It is a pathology that in its early stages does not reveal any symptoms, resulting in diagnosis in advanced stages which compromises the treatment and quality of life of the patient. Although there are already some early diagnosis methodologies based on biomarker analysis, these are time consuming, expensive and require sophisticated equipment and qualified technicians. Like this, it is expected that the development of alternative analytical strategies that simplify the analysis methodology will greatly contribute to an earlier diagnosis of the disease. Therefore, in the present work the development of an electrochemical immunoassay for the diagnosis of chronic kidney disease is proposed through the detection of cystatin C. The used sensing strategy combined the versatility and low cost of screen-printed electrodes with the high selectivity of a “sandwich” type magnetoimmunoassay, using magnetic beads modified with the capture antibody. The interaction between the detection antibody and the analyte was monitored, employing an enzymatic label, through the electrochemical detection of an enzymatic reaction product. After the optimization of the experimental conditions the response of the immunoassay to increasing concentrations of the analyte showed a linear range between 5 ng/mL and 25 ng/mL of cystatin C, with a limit of detection of 2.1 ng/mL. Furthermore, real patient samples with chronic kidney disease were successfully analyzed, which proved that the developed methodology was able to detect this biomarker in the early stages of the disease with an acceptable accuracy. The developed assay provided highly precise results (coefficient of variation below 10%) within 4 hours.

According to the obtained results it is expected that the proposed immunoassay could be useful in the early and decentralized diagnosis of chronic kidney disease.

Keywords: electrochemical immunoassay, biomarker, cystatin C, chronic kidney disease, magnetic beads, screen-printed electrodes.

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas e de Siglas	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Tema e Objetivos da Dissertação.....	1
1.3. Apresentação do Centro de Investigação	1
1.4. Organização da Tese	2
2. Fundamentos Teóricos	3
2.1. Doença Renal Crónica	3
2.2. Biomarcadores para o Diagnóstico da Doença Renal Crónica	5
2.3. Biossensores e Imunoensaios Eletroquímicos	7
2.3.1. Imunoensaios: o Complexo Anticorpo-Antigénio.....	9
2.3.2. Marca Enzimática: Fosfatase Alcalina	11
2.3.3. Partículas Magnéticas no Desenvolvimento de Imunoensaios.....	12
2.3.4. Eléctrodos Serigrafados.....	13
2.4. Voltametria	15
2.4.1. Voltametria Cíclica.....	16
2.4.2. Voltametria de Varrimento Linear	17
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Material e Equipamento	19
3.2. Reagentes e Soluções	19
3.2.1. Reagentes.....	19
3.2.2. Soluções.....	20
3.3. Procedimento Analítico	21
I. Ligação do CAb às MBs	21
II. Verificação da Imobilização do CAb nas MBs utilizando um Anti-IgG Biotinilado.....	22
III. Ensaio para Detecção da Cistatina C	24

3.4.	Representação Esquemática do Imunoensaio	26
4.	Resultados e Discussão	27
4.1.	Otimização do Protocolo de Modificação das MBs com o CAb	27
4.1.1.	Verificação da Ligação do CAb às MBs	28
4.1.2.	Otimização do Bloqueio dos Grupos Carboxílicos das MBs	29
4.1.3.	Avaliação da Estabilidade das MBs-CAb	30
4.1.4.	Aplicação do Ensaio na Detecção da CysC.....	30
4.2.	Avaliação da Biofuncionalidade do Imunoensaio	32
4.3.	Otimização dos Parâmetros Experimentais	33
4.3.1.	Avaliação da Etapa de Bloqueio.....	33
4.3.2.	Otimização da Concentração do Substrato Enzimático (3-IP/Ag ⁺).....	34
4.3.3.	Otimização da Concentração da Enzima (STR-ALP).....	36
4.3.4.	Otimização da Concentração do CAb	38
4.3.5.	Otimização da Concentração e do Tempo de Incubação do DAb.....	39
4.3.6.	Avaliação da Otimização da Concentração da Enzima e Otimização do Tempo de Incubação da mesma	41
4.4.	Curva de Calibração.....	43
4.5.	Precisão	45
4.6.	Análise de Amostras Reais	45
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras	47
	Referências Bibliográficas.....	49

Índice de Figuras

Figura 1.1: Localização das instalações do GRAQ situadas no campus do ISEP: edifício G, piso 1.....	2
Figura 2.1: Representação gráfica da TFG em função da progressão da DRC e influência do estágio da doença na função renal.	4
Figura 2.2: Representação gráfica da relação entre a TFG estimada e as concentrações de Cr e CysC.....	6
Figura 2.3: Representação esquemática do princípio de funcionamento dos biossensores eletroquímicos.	8
Figura 2.4: Representação esquemática de um anticorpo (IgG).....	9
Figura 2.5: Representação esquemática de um anticorpo monoclonal acoplado ao epítopo específico do antígeno representado por um quadrado (A) e de um anticorpo policlonal ligado a diferentes epítopos do antígeno (B).....	10
Figura 2.6: Representação esquemática de um imunoensaio “sanduíche”.....	10
Figura 2.7: Representação esquemática da reação enzimática da ALP usando 3-IP e iões Ag^+	11
Figura 2.8: Representação esquemática de um SPE.....	13
Figura 2.9: Comparação das dimensões do SPE com uma célula eletroquímica convencional.....	14
Figura 2.10: Exemplo de um voltamograma cíclico para um sistema redox reversível ($O + ne^- \leftrightarrow R$).	17
Figura 3.1: Representação esquemática do imunoensaio desenvolvido para o diagnóstico da DRC.....	26
Figura 4.1: Exemplo de um voltamograma de varrimento linear típico destes imunoensaios.	27
Figura 4.2: Representação gráfica dos resultados obtidos para verificação da modificação das MBs com CAb. Parâmetros experimentais: CAb 0 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$; anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/ Ag^+ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.....	28
Figura 4.3: Representação gráfica dos resultados obtidos para otimização do bloqueio dos grupos -COOH das MBs. Parâmetros experimentais: CAb 0 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$;	

anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 29

Figura 4.4: Representação gráfica dos resultados da avaliação da estabilidade das MBs-CAb. Parâmetros experimentais: CAb 0 µg/mL e 10 µg/mL; anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 30

Figura 4.5: Representação gráfica dos resultados da resposta do imunoensaio à CysC quando o mesmo é efetuado em tubos separados e no mesmo tubo. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 31

Figura 4.6: Representação gráfica dos resultados da avaliação da biofuncionalidade do imunoensaio. Parâmetros experimentais: CAb 0 µg/mL e 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 0 µg/mL e 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições. 32

Figura 4.7: Representação gráfica dos resultados obtidos para avaliação da etapa de bloqueio com BSA referida no procedimento III. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 34

Figura 4.8: Voltamogramas (LSV) resultantes do imunoensaio para otimização da concentração do substrato enzimático. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM e 1 mM / 0,4 mM. 34

Figura 4.9: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do substrato enzimático. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM e 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 35

Figura 4.10: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:300 000, 1:600 000 e 1:1 200 000 e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições. 36

Figura 4.11: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da enzima. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2

$\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:300 000, 1:300 000 com 0,1% de BSA e 1:300 000 com 0,5% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 37

Figura 4.12: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:300 000 com 0,1% de BSA e 1:100 000 também com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 38

Figura 4.13: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do CAb. Parâmetros experimentais: CAb 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 39

Figura 4.14: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do DAb. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 40

Figura 4.15: Representação gráfica dos resultados da otimização do tempo de incubação do DAb. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 41

Figura 4.16: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:500 000, 1:100 000 e 1:10 000 todas com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 42

Figura 4.17: Representação gráfica dos resultados da otimização do tempo de incubação da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições..... 43

Figura 4.18: a) Voltamogramas típicos da resposta do imunoensaio a concentrações crescentes de CysC; b) Representação gráfica dos resultados da intensidade da corrente dos picos em função da concentração crescente de CysC. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL,

100 ng/mL e 500 ng/mL; DAb 2 μ g/mL; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições..... 44

Figura 4.19: Curva de Calibração. Parâmetros experimentais: CAb 10 μ g/mL; CysC 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 25 ng/mL; DAb 2 μ g/mL; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM..... 45

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Sinais de excitação e voltamogramas das voltametrias de varrimento linear e cíclica.....	16
Tabela 4.1: Comparação dos resultados obtidos com o PENIA e com o imunoensaio desenvolvido para a determinação da CysC em amostras de soro humano.	46

Lista de Abreviaturas e de Siglas

3-IP	3-indoxil fosfato (<i>3-Indoxyl Phosphate</i>)
ALP	Fosfatase Alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
anti-IgG-biotina	Anti imunoglobulina G conjugada com biotina
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAb	Anticorpo de Captura (<i>Capture Antibody</i>)
CE	Eléctrodo Auxiliar (<i>Counter Electrode</i>)
Cr	Creatinina
CV	Voltametria Cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
CysC	Cistatina C (<i>Cystatin C</i>)
DAb	Anticorpo de Detecção (<i>Detection Antibody</i>)
DRC	Doença Renal Crónica
E	Potencial aplicado
EDC	Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>)
GRAQ	Grupo de Reação e Análises Químicas
i	Intensidade de corrente
Ig	Imunoglobulina (anticorpo)
IgG	Imunoglobulina G
i _p	Intensidade de corrente do pico voltamétrico
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LSV	Voltametria de Varrimento Linear (<i>Linear Sweep Voltammetry</i>)
MBs	Partículas Magnéticas (<i>Magnetic Beads</i>)
NHS	N-hidroxisuccinimida
PENIA	Imunoensaio Nefelométrico com Partículas Modificadas (<i>particle-enhanced nephelometric immunoassays</i>)
PETIA	Imunoensaio Turbidimétrico com Partículas Modificadas (<i>particle-enhanced turbidimetric immunoassays</i>)
POC	<i>Point-of-care</i>

RE	Eléctrodo de Referência (<i>Reference Electrode</i>)
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia
S/B	Razão entre o sinal de interesse analítico e o branco
SPCE	Eléctrodo serigrafado de carbono (<i>Screen-Printed Carbon Electrode</i>)
SPEs	Eléctrodos serigrafados (<i>Screen-Printed Electrodes</i>)
STR-ALP	Estreptavidina conjugada com Fosfatase Alcalina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
WE	Eléctrodo de Trabalho (<i>Working Electrode</i>)

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Este trabalho inseriu-se no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio para a conclusão do Mestrado em Engenharia Química, ramo de Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

Os estudos conducentes a esta dissertação foram realizados no Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ), situado no ISEP.

1.2. Tema e Objetivos da Dissertação

A dissertação teve como tema “Desenvolvimento de um imunoenensaio eletroquímico para o diagnóstico da doença renal crónica”. Assim, os objetivos do trabalho consistiram na seleção do transdutor, do formato do ensaio e da estratégia de deteção e na otimização do procedimento analítico e sua aplicação.

1.3. Apresentação do Centro de Investigação

O GRAQ é um dos grupos de investigação do ISEP (Figura 1.1), exercendo a sua atividade desde janeiro de 1999. Embora fosse considerado um grupo com autonomia científica e financeira, até novembro de 2001, o GRAQ pertenceu ao Centro de Química da Universidade do Porto. Após essa data, este grupo de investigação do ISEP passa a integrar a Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE), que é considerada a maior rede de Química e Engenharia Química em Portugal e reconhecida pelo Ministério Português da Ciência e do Ensino Superior como Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) [1].

Atualmente, o GRAQ tem como linhas de investigação e desenvolvimento as seguintes áreas: química analítica, onde se insere esta dissertação, ambiente, sustentabilidade e tratamento de resíduos laboratoriais [2]. Este centro de investigação é coordenado cientificamente pela Doutora Cristina Delerue-Matos [1].



Figura 1.1: Localização das instalações do GRAQ situadas no campus do ISEP: edifício G, piso 1. Adaptada de [3].

1.4. Organização da Tese

A presente dissertação foi estruturada do seguinte modo:

No capítulo 1 faz-se um enquadramento do trabalho, referindo o seu tema e objetivos, e uma breve apresentação do laboratório onde foram realizados os trabalhos experimentais.

No capítulo 2 referem-se os fundamentos teóricos relativos à doença renal crónica, biomarcadores do dano renal, biossensores eletroquímicos e marcas enzimáticas, partículas magnéticas, eléctrodos serigrafados e técnicas voltamétricas.

No capítulo 3 procede-se à descrição do material e equipamento utilizados, das soluções e reagentes necessários ao desenvolvimento do imunoensaio e dos procedimentos analíticos efetuados.

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos e a respetiva discussão.

No capítulo 5 mencionam-se as principais conclusões obtidas e sugerem-se algumas propostas de trabalhos futuros.

2. Fundamentos Teóricos

2.1. Doença Renal Crónica

Os rins são órgãos que desempenham funções de controlo da composição corporal através da excreção dos produtos resultantes do metabolismo, removendo, assim, os produtos tóxicos e as substâncias que se encontram em excesso no plasma, sob a forma de urina. Os rins desempenham, ainda, uma função endócrina relevante [4].

O rim pode ser maioritariamente dividido em duas regiões: a medula, região mais interna, e o córtex, que corresponde à parte mais externa deste órgão. Nestas encontram-se as unidades funcionais do rim que são estruturas microscópicas designadas por nefrónios. Estima-se que um rim saudável possua entre 1 a 2 milhões de nefrónios e cada nefrónio é constituído por uma estrutura tubular denominada tubo urinífero. Cada tubo urinífero inicia-se na zona do córtex renal por uma unidade em forma de saco denominada de cápsula de Bowman. A cápsula de Bowman, por sua vez, envolve um novelo de capilares sanguíneos, o glomérulo de Malpighi, que é originário da arteríola aferente. Deste glomérulo parte outra arteríola, a eferente, a partir da qual se forma uma rede de capilares que envolvem a restante parte do tubo urinífero. A urina é produzida nos rins como resultado de um processo de filtração, reabsorção e secreção de substâncias transportadas pelo sangue. Neste processo verifica-se, ao nível das cápsulas de Bowman, a filtração de uma parte do plasma, que passa dos capilares glomerulares para os tubos uriníferos. Nos tubos uriníferos ocorrerem ainda processos de reabsorção e secreção. Os tubos uriníferos reúnem-se em tubos coletores da urina a qual é, finalmente, recolhida no bacinete. A partir desta estrutura parte um ureter que transporta a urina para a bexiga [4, 5]. O correto funcionamento dos rins é, assim, fundamental e imprescindível.

Uma patologia severa da função renal denomina-se Doença Renal Crónica (DRC). Esta condição crónica consiste numa lesão, com duração igual ou superior a 3 meses, onde se verifica a perda progressiva e irreversível da função dos rins, uma vez que se danificam as estruturas renais impedindo o seu funcionamento [6, 7]. A DRC pode resultar de doenças primárias do rim, mas também de complicações de outras patologias crónicas, nomeadamente a diabetes, a hipertensão arterial grave e doenças

autoimunes. Como consequências secundárias graves da DRC encontram-se as doenças cardiovasculares [8, 9].

De modo a compreender melhor esta doença é necessário referir que a DRC se divide em 5 estádios, sendo que é frequente o estágio 3 se subdividir em dois (3a e 3b). Tendo em consideração esta divisão, é possível designar os estádios 1 a 3a por fase inicial e os estádios 3b a 5 por fase final. O diagnóstico, assim como o estágio da doença, é normalmente determinado com base na Taxa de Filtração Glomerular (TFG). A TFG é uma medida da função renal e pode ser calculada através de equações específicas que incluem a concentração de creatinina presente no sangue do paciente e que têm em consideração diversos fatores, tais como a idade, a etnia, o género, entre outros. É relevante referir que quanto menor for a TFG, mais avançado será o estágio da doença e, conseqüentemente, maior será o risco de progressão da mesma, tal como se verifica na Figura 2.1 [9, 10, 11]. Na Figura 2.1 também é possível observar a influência do estágio da doença na função renal.



Figura 2.1: Representação gráfica da TFG em função da progressão da DRC e influência do estágio da doença na função renal. Adaptada de [10].

Nos estádios iniciais, a DRC é silenciosa e assintomática. Assim, é importante reforçar que o diagnóstico precoce, estádios 1 a 3a, pode abrandar a progressão da DRC e reduzir as complicações através do início atempado do tratamento. Além disso, o diagnóstico durante os estádios incipientes desta patologia pode potencialmente favorecer a reversibilidade da função renal perdida. No entanto, se diagnosticada nos estádios 3b a 5 já se observa um dano renal extenso, que geralmente resulta em DRC terminal e na necessidade de tratamentos de substituição da função renal [12, 13].

A incidência da DRC tem vindo a aumentar. Em Portugal estima-se que existam mais de 800 mil pacientes a sofrer desta patologia. De acordo com as estatísticas da unidade de saúde CUF, todos os anos são registados 2200 novos casos de DRC em estágio terminal, existindo 14 mil utentes dependentes de diálise, dos quais 5000 são transplantados [6]. Neste sentido, a DRC, principalmente nos estádios finais, implica uma despesa elevada para o sistema de saúde. Não obstante os avanços na gestão da patologia e melhora nas técnicas de diálise, a taxa de mortalidade ainda permanece elevada, razão pela qual o diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais [14].

2.2. Biomarcadores para o Diagnóstico da Doença Renal Crónica

O diagnóstico da DRC ocorre, normalmente, em estádios avançados, o que compromete o tratamento e qualidade de vida do paciente. Neste sentido, a análise rápida e específica de biomarcadores poderá ser uma ótima contribuição para a prevenção e diagnóstico precoce desta patologia [12, 13]. De facto, a identificação destes é uma área de investigação emergente e de extrema importância [15].

Os biomarcadores são substâncias que podem ser medidas experimentalmente e que indicam a presença, gravidade ou progressão de uma determinada patologia [16]. No âmbito desta dissertação, os biomarcadores mencionados têm como objetivo diagnosticar e/ou identificar a gravidade ou progressão da DRC.

A concentração de biomarcadores séricos endógenos, como a creatinina (Cr), é usada para estimar a TFG. No entanto, as concentrações séricas de Cr só aumentam significativamente quando cerca de 50% a 60% da parte funcional do rim já se encontra lesada ou, na pior das hipóteses, quando o rim já está irreversivelmente danificado, o que compromete a deteção precoce da DRC e/ou conduz a falsos negativos e, portanto, traduz-se na demora nos diagnósticos detalhados e na implementação célere de

tratamentos [11, 12]. Posto isto, um biomarcador adequado para a monitorização da DRC deve ser detetado rapidamente, preferencialmente de forma não invasiva e nos estádios iniciais da doença, e as medições efetuadas devem ser facilmente correlacionadas com a patologia do tecido renal. Além disso, a concentração do biomarcador não deve ser influenciado pela idade, estado nutricional ou por outros problemas de saúde que o indivíduo possua em simultâneo. Assim, um biomarcador apropriado deve ser específico para doenças renais e deve ser possível a sua deteção em níveis reduzidos, permitindo o diagnóstico da doença nos estádios iniciais da mesma [12].

Neste sentido, a cistatina C (CysC) foi proposta como um novo biomarcador para a TFG, uma vez que a sua concentração sérica varia mais rapidamente ao declínio da função renal, mesmo na fase inicial, como se ilustra na Figura 2.2 [11].

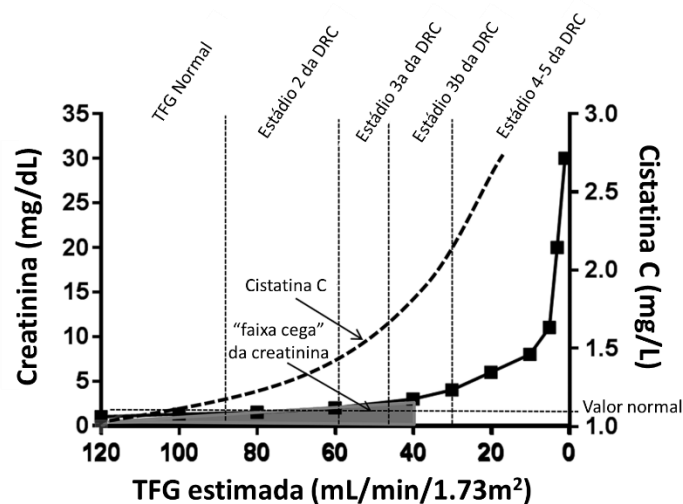


Figura 2.2: Representação gráfica da relação entre a TFG estimada e as concentrações de Cr e CysC. Adaptada de [11].

Por observação da Figura 2.2 verifica-se que os níveis da Cr sérica não apresentam uma variação significativa aquando de pequenas alterações na função renal, o que corresponde especialmente aos estádios iniciais da DRC. Assim sendo, constata-se que a concentração de Cr no soro só ultrapassa o valor limite de concentração considerado normal (sem patologia) após a redução em 50% da filtração glomerular. A sombreado encontra-se representada a denominada “faixa cega” da Cr sérica, na qual este biomarcador tradicional não tem sensibilidade suficiente para determinar claramente se o paciente desenvolveu a DRC e em que fase de progressão é que a

doença se encontra [11]. Comparativamente, verifica-se que os níveis de CysC aumentam mais precocemente, portanto, conclui-se que esta é mais adequada do que a Cr para o diagnóstico precoce. Por esse motivo, a CysC tem sido considerada um potencial biomarcador da DRC e também uma alternativa promissora para substituir a Cr sérica no cálculo da TFG [11, 17].

A CysC é uma proteína de baixo peso molecular (13,3 kDa) produzida em todas as células nucleadas, filtrada através do glomérulo e, posteriormente, reabsorvida e metabolizada nos túbulos proximais que fazem parte do tubo urinífero. A concentração sérica deste biomarcador endógeno é constante e, em comparação com a Cr, a CysC não é influenciada pela idade, género, etnia, massa muscular e/ou estado nutricional [18, 19]. Tendo em consideração que a elevada concentração de CysC está inerentemente associada à redução da função renal e, conseqüentemente, à progressão da DRC, já se encontram disponíveis diversas metodologias de diagnóstico baseadas neste biomarcador, sendo que as mais atrativas são os imunoenaios turbidimétricos e nefelométricos com partículas modificadas (PETIA e PENIA, respetivamente) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Contudo, apesar de rápidos e sensíveis, verificou-se que os PETIA e os PENIA são métodos dispendiosos e que requerem equipamentos sofisticados. Nos ELISA são utilizados *kits* de teste dispendiosos e equipamentos de grande dimensão que limitam a sua aplicação em análises *point-of-care* (POC) [14, 18, 20]. Neste sentido surge a necessidade de desenvolver ferramentas para diagnósticos mais simples e acessíveis.

Os biossensores e bioensaios eletroquímicos, devido às suas características analíticas, aparecem como uma alternativa competitiva para o desenvolvimento de dispositivos de fácil manuseio e de elevada sensibilidade e seletividade para uma análise rápida e descentralizada [20, 21].

2.3. Biossensores e Imunoenaios Eletroquímicos

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biossensor eletroquímico (Figura 2.3) é um dispositivo capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa, através da utilização de um elemento de reconhecimento biológico (biorrecetor), que está em contacto com um elemento de transdução [22]. Assim, o analito (biomarcador) presente na amostra é

reconhecido pelo biorreceptor e esta interação gera um sinal químico que é convertido pelo transdutor num sinal físico que pode ser medido e detetado por um processador de sinal [23]. Com base nesta tecnologia, o exemplo mais conhecido é o biossensor de glicose, mundialmente utilizado e estabelecido no quotidiano dos pacientes diabéticos [21].

De acordo com o tipo de elemento de biorreconhecimento, os biossensores podem dividir-se em biossensores enzimáticos, genossensores, imunossensores, entre outros. Os imunossensores eletroquímicos, que se baseiam em interações entre um anticorpo e um antígeno na superfície do transdutor [24], são especialmente interessantes devido à elevada disponibilidade de anticorpos seletivos para uma diversidade de analitos relevantes.

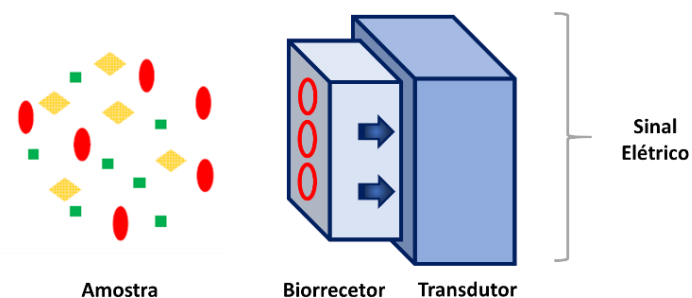


Figura 2.3: Representação esquemática do princípio de funcionamento dos biossensores eletroquímicos.

De modo semelhante aos imunossensores descritos anteriormente, os imunoensaios eletroquímicos também são utilizados para detetar a ligação anticorpo-antígeno [25]. No entanto, no caso dos imunoensaios, o complexo antígeno-anticorpo não se forma na superfície do eléctrodo, uma vez que este é apenas utilizado como superfície transdutora do sinal analítico. Os imunoensaios eletroquímicos caracterizam-se por combinar a elevada seletividade da ligação anticorpo-antígeno com a alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos, pela simplicidade da instrumentação e pela variedade de marcas disponíveis, tanto enzimáticas como eletroativas [26]. Portanto, a utilização de técnicas de análise eletroquímicas como alternativa aos métodos imunoquímicos clássicos apresenta-se como uma alternativa promissora, especialmente com vista ao desenvolvimento de dispositivos de análise descentralizada [26].

2.3.1. Imunoensaios: o Complexo Anticorpo-Antigénio

Anticorpos, também denominados imunoglobulinas (Ig), são uma família de glicoproteínas capaz de reconhecer antígenos com alta especificidade, sendo que a mais utilizada em imunoensaios é a IgG. Os anticorpos normalmente são representados como uma molécula na forma de “Y” (Figura 2.4). Cada molécula “Y” contém dois tipos distintos de cadeias polipeptídicas que diferem de acordo com o seu peso molecular. Como se observa na Figura 2.4, um anticorpo apresenta quatro cadeias peptídicas: duas cadeias menores, designadas cadeias “leves”, com um peso molecular individual de aproximadamente 25 kDa, e duas cadeias maiores com um peso molecular de aproximadamente 50 kDa cada, conhecidas como cadeias “pesadas”. Ambas as cadeias pesadas e leves são divididas em regiões constantes e variáveis com base na variabilidade de sequência de aminoácidos. As cadeias são mantidas juntas através de ligações dissulfureto (S-S) [24].

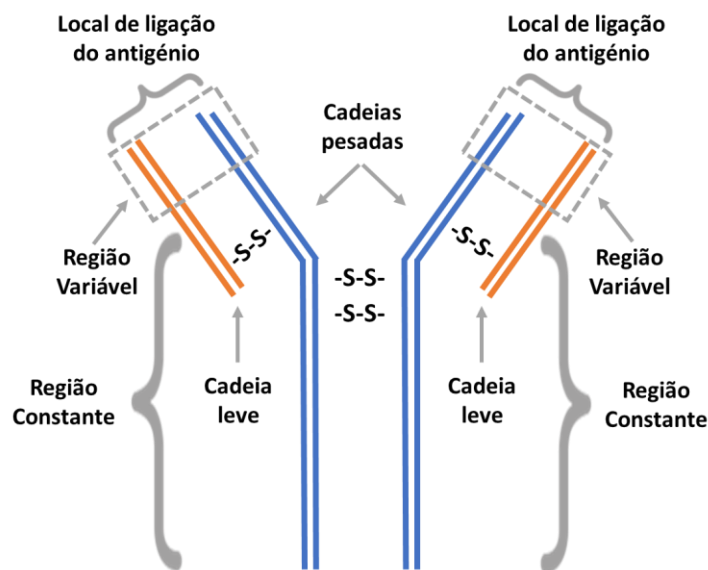


Figura 2.4: Representação esquemática de um anticorpo (IgG).

Os anticorpos podem ser divididos em monoclonais e policlonais, dependendo do epítopo (região do antígeno que interage com o anticorpo) que reconhecem. Neste sentido, como o nome indica, os anticorpos monoclonais (Figura 2.5 A) são específicos para um único epítopo, diminuindo, assim, a possibilidade de reatividade cruzada, enquanto que os anticorpos policlonais (Figura 2.5 B) se podem ligar a epítomos distintos do antígeno, mostrando uma resposta imunológica heterogénea [24]. A

interação com o epítopo estabelece-se através do local de ligação ao antígeno presente no anticorpo e que se denomina parátopo.

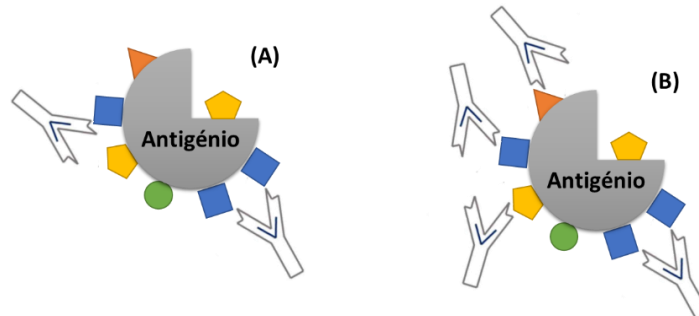


Figura 2.5: Representação esquemática de um anticorpo monoclonal acoplado ao epítopo específico do antígeno representado por um quadrado (A) e de um anticorpo policlonal ligado a diferentes epítopos do antígeno (B). Adaptada de [24].

Num formato típico de um imunoensaio não competitivo, também conhecido como “sanduíche” (Figura 2.6), o analito da amostra é capturado por um excesso de anticorpos de captura (Υ) e, após a interação entre os anticorpos imobilizados e os antígenos livres (\bullet), é adicionado um excesso de anticorpos secundários (Υ), que se ligam ao analito [27]. Neste sentido, num imunoensaio não competitivo ideal, seria expectável que não existisse sinal na ausência de analito, uma vez que não existem locais de ligação disponíveis para o anticorpo secundário. No entanto, na prática, muitas vezes isto não se verifica devido a interações não específicas entre o anticorpo secundário e outros componentes do imunoensaio. Assim sendo, é recomendável o uso de um agente bloqueante para reduzir essas mesmas interações não específicas. É, ainda, importante referir que os anticorpos secundários podem estar diretamente conjugados com uma marca enzimática ou eletroativa ou podem ser utilizados reagentes adicionais no ensaio com essa função que se unirão ao anticorpo secundário não conjugado.

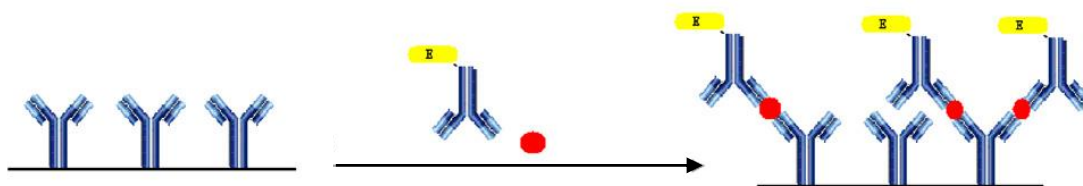


Figura 2.6: Representação esquemática de um imunoensaio “sanduíche”. Adaptada de [27].

2.3.2. Marca Enzimática: Fosfatase Alcalina

No desenvolvimento de imunoensaios, a fosfatase alcalina (ALP) é amplamente usada como marca enzimática [28]. A ALP exibe o seu desempenho ótimo em valores de pH alcalinos e é utilizada para gerar produtos eletroativos, uma vez que a maioria pode ser detetada e quantificada por métodos eletroquímicos [29].

Ao longo dos anos, foram estudados vários substratos da ALP que após reação enzimática dão origem a um produto útil para o uso em imunoensaios. Assim, alguns dos substratos já descritos para esta enzima são: catecol monofosfato, 3-indoxil fosfato, hidroquinona difosfato, 4-fosfato de nitrofenol, fosfato de p-aminofenilo, 1-naftil fosfato, fenil fosfato e ácido 2-fosfo-l-ascórbico. Durante a reação enzimática, estes substratos são convertidos nas respetivas espécies eletroativas: catecol, índigo carmim, hidroquinona, 4-nitrofenol, 4-aminofenol, 1-naftol, fenol e ácido l-ascórbico [29].

Fanjul *et al.* [30] descreveram um novo substrato eletroquímico para a ALP, o qual consiste na utilização de uma mistura de 3-indoxil fosfato (3-IP) e de iões prata (Ag^+). O 3-IP é constituído por um anel indólico substituído na posição 3 por um grupo fosfato. Na presença de ALP este substrato é hidrolisado nessa posição, dando origem a um indoxil intermediário. Este indoxil intermediário oxida, produzindo azul de índigo (insolúvel), e reduz os iões prata presentes em solução a prata metálica. Neste sentido, o sinal analítico corresponde à intensidade da corrente gerada pela redissolução anódica da prata metálica depositada, sendo esta medida por voltametria de varrimento linear [30]. A vantagem deste substrato está relacionada com o facto dos iões prata atuarem como potenciadores da reação enzimática aumentando a sensibilidade do ensaio. No presente trabalho seleccionou-se a ALP como marca enzimática e o 3-IP/ Ag^+ como substrato da mesma, de acordo com o mecanismo descrito anteriormente e que se encontra representado na Figura 2.7.

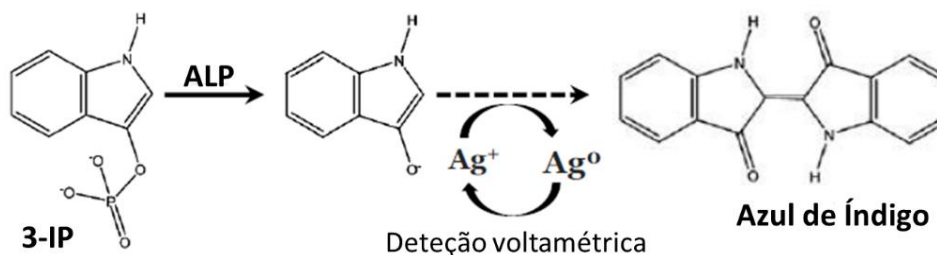


Figura 2.7: Representação esquemática da reação enzimática da ALP usando 3-IP e iões Ag^+ .

2.3.3. Partículas Magnéticas no Desenvolvimento de Imunoensaios

Atualmente, uma das estratégias que tem suscitado maior interesse para o desenvolvimento de imunoensaios eletroquímicos consiste no uso de partículas magnéticas (MBs) como suporte de imobilização do elemento de reconhecimento [31, 32]. Deste modo, este é colocado na superfície de um eletrodo não modificado para a medição do produto enzimático apenas no fim do imunoensaio, sendo que, nestes casos, o eletrodo só atua como transdutor de sinal [32].

As MBs são usualmente compostas por material ferromagnético, mais concretamente ferrite e magnetite (Fe_2O_3 e Fe_3O_4). As MBs podem ser facilmente funcionalizados com diferentes grupos de ligação fundamentais para a imobilização rápida e específica do elemento de reconhecimento a utilizar no ensaio a desenvolver [32, 33]. Como exemplos desses grupos de ligação pode-se indicar a estreptavidina [34], anticorpos ou proteínas [35, 36], grupos tosilo [37], grupos amino [38] e grupos carboxílicos [39]. As MBs utilizadas no presente trabalho são partículas compostas por poliestireno altamente reticulado com material magnético uniformemente distribuído e revestidas com uma camada hidrofílica de éter glicidílico, de modo a proteger o óxido de ferro e, assim, reduzir as ligações não específicas. Adicionalmente, estas partículas apresentam a superfície funcionalizada com ácido carboxílico e possuem 1 μm de diâmetro [33].

A sua reduzida dimensão e geometria esférica possibilita que um elevado número de biomoléculas possa ser imobilizado na superfície de cada partícula magnética, o que melhora a sensibilidade do imunoensaio, reduz os tempos de reação e permite a utilização de menores volumes na superfície do eletrodo de trabalho. A separação magnética pode também desempenhar um papel importante em amostras/matrizes complexas, uma vez que permite eliminar eventuais interferentes nas lavagens efetuadas durante o ensaio. Uma vantagem adicional da imobilização do anticorpo de captura nas MBs é o facto desta modificação poder ser efetuada em elevadas quantidades numa única etapa, podendo o complexo anticorpo de captura-MBs ser armazenado durante algumas semanas sem perda de atividade, o que possibilita a redução do tempo de análise quando se espera um elevado número de amostras. Um inconveniente na utilização de MBs é o facto do elemento de reconhecimento não estar em contato direto com a superfície do eletrodo, o que poderia representar limitações na

sensibilidade do método. No entanto, de modo a contrariar esta desvantagem utilizam-se elétrodos cujas superfícies são magnetizadas ou colocam-se pequenos ímanes por baixo da superfície do elétrodo de trabalho, o que concentra as MBs na superfície do mesmo [32].

2.3.4. Elétrodos Serigrafados

Elétrodos serigrafados - do inglês *screen-printed electrodes* (SPEs) - são superfícies, geralmente de cerâmica, papel ou plástico, que contêm, pelo menos, uma célula eletroquímica serigrafada. Estes elétrodos podem apresentar a configuração típica de uma célula eletroquímica de 3 elétrodos constituída pelos elétrodos de trabalho (WE), auxiliar (CE) e de referência (RE), como se verifica na Figura 2.8 [40].

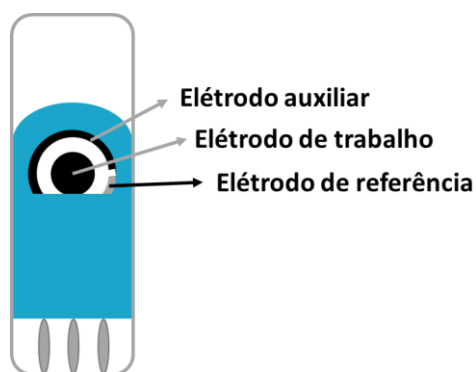


Figura 2.8: Representação esquemática de um SPE.

No WE é onde ocorre a reação de interesse, isto é, a reação de oxidação/redução da espécie eletroativa. O RE é o elétrodo em relação ao qual se controla o potencial aplicado no WE. Nos RE convencionais (por exemplo: Ag/AgCl) o elétrodo de referência possui um potencial que se mantém constante durante o ensaio. No caso dos SPEs, devido às suas reduzidas dimensões (Figura 2.9) e construção com base na serigrafia, existem algumas diferenças a destacar: o RE é um elétrodo sólido, impresso, de prata, que funciona como um pseudo-referência (pseudo-RE). Assim, como consequência, o potencial pode não ser totalmente reproduzível e estável ao longo de um ensaio e poderão observar-se ligeiros desvios de potencial. Na utilização de SPEs para o desenvolvimento de biossensores ou bioensaios, a utilização de um pseudo-RE usualmente não constitui um problema, uma vez que a variação do potencial aplicado ou medido, neste tipo de ensaios, não costuma ser significativa. A introdução de um terceiro elétrodo na célula eletroquímica, designado CE, está relacionada com a

necessidade de minimizar a queda ohmica que se forma devido à resistência do eletrólito entre os elétrodos. Na presença do CE, a passagem da corrente elétrica restringe-se entre o WE e aquele, evitando interferências no RE. Adicionalmente, a proximidade estratégica entre os RE e WE contribui também para que a queda ohmica entre eles seja desprezável. O tipo de desenho e tamanho dos SPEs torna-se assim vantajoso uma vez que permite que aqueles elétrodos se posicionem muito próximos na célula eletroquímica serigrafada. De modo a controlar o potencial do WE relativamente ao RE, assim como a sua variação, utiliza-se um potencióstato.

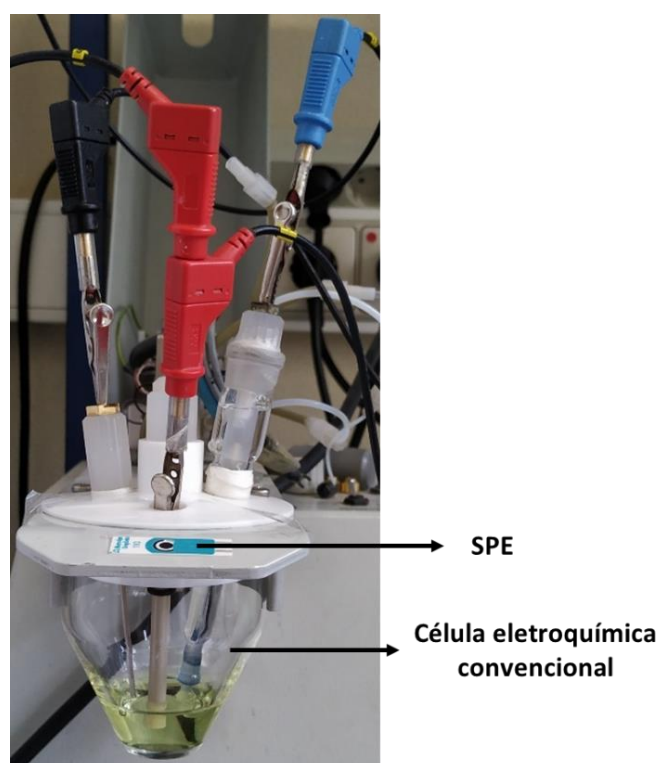


Figura 2.9: Comparação das dimensões do SPE com uma célula eletroquímica convencional.

Os SPEs possuem inúmeras vantagens sobre os elétrodos convencionais, os quais exigem protocolos laboriosos de polimento para a renovação da superfície sensora, assim como um elevado gasto de (bio)reagentes. Adicionalmente, as grandes dimensões das células eletroquímicas convencionais dificultam a transferência dos sensores desenvolvidos para análises POC. Por outro lado, os SPEs, devido ao reduzido tamanho da célula eletroquímica (que evita a utilização de volumes elevados de reagentes durante os ensaios), a facilidade de uso, o baixo custo, a possibilidade de miniaturização, a versatilidade e a incorporação em sistemas de análise portátil, são amplamente utilizados no desenvolvimento de biossensores e/ou bioensaios para uso

descentralizado. Assim, vários ensaios eletroquímicos baseados em SPEs foram já descritos para aplicações analíticas em áreas tão diversas como o sector clínico, alimentar e ambiental [41-43].

2.4. Voltametria

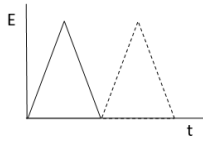
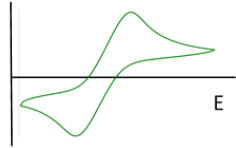
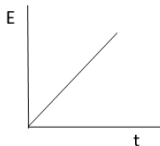
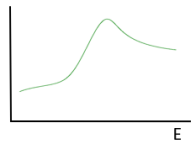
A voltametria compreende um conjunto de técnicas onde, durante um processo eletroquímico, as características de uma espécie eletroativa em solução (eletrolito) poderão ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente através do potencial de oxidação/redução e da intensidade de corrente gerada na célula eletroquímica como resposta a uma variação de potenciais. A representação gráfica da intensidade de corrente em função do potencial aplicado é denominada voltamograma. O parâmetro ajustado é o potencial aplicado (E), definido relativamente a um RE, e o parâmetro medido é a intensidade de corrente resultante (i) [44].

Os fenómenos registados em voltametria ocorrem na interface entre a superfície do WE e a camada fina de solução adjacente a essa mesma superfície. A corrente obtida pode resultar de uma transferência de eletrões do eléctrodo para a solução ou vice-versa. Quando a corrente de eletrões flui do eléctrodo para a solução, a espécie eletroativa presente será reduzida (corrente catódica). Por outro lado, a espécie eletroativa será oxidada se o fluxo de eletrões ocorrer daquela para o eléctrodo (corrente anódica). Assim, a intensidade da corrente obtida pela transferência de eletrões durante um processo redox pode ser relacionada com a quantidade de espécie eletroativa presente na célula eletroquímica [44]. Neste sentido é importante referir que, na voltametria, a corrente de interesse analítico é a corrente faradaica, que surge devido à oxidação ou à redução da espécie eletroativa no WE. No entanto, na célula eletroquímica também se produz outra corrente, designada corrente capacitiva (não faradaica), que não está relacionada com o processo redox de interesse. Assim, esta corrente deve ser minimizada, uma vez que interfere no sinal medido, pois corresponde à atração ou à repulsão eletrostática entre os iões em solução e os eletrões no eléctrodo [45].

Tendo em consideração que nesta técnica eletroquímica o potencial aplicado no WE varia sistematicamente enquanto a intensidade de corrente é medida, verificam-se diferentes representações do potencial aplicado no eléctrodo em função do tempo, sendo que estes gráficos são designados sinais de excitação [46]. Na Tabela 2.1 evidenciam-se

as representações gráficas dos sinais de excitação e exemplos dos respetivos voltamogramas dos dois tipos de voltametria utilizados nesta dissertação: voltametria cíclica (CV) e voltametria de varrimento linear (LSV).

Tabela 2.1: Sinais de excitação e voltamogramas das voltametrias de varrimento linear e cíclica.

Tipo de Voltametria	Sinal de Excitação	Voltamograma
Voltametria Cíclica		
Voltametria de Varrimento Linear		

2.4.1. Voltametria Cíclica

A CV é uma técnica amplamente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos [44]. A corrente registada varia em função do potencial, aplicado em forma de onda triangular, desde um potencial inicial onde não deve ocorrer nenhuma resposta eletroquímica até um valor que ultrapasse o potencial de equilíbrio da espécie de interesse. Um ensaio de CV pode compreender um ciclo completo, um ciclo parcial ou, ainda, vários ciclos. Assim, na Figura 2.10, observa-se um voltamograma cíclico constituído por um ciclo completo, uma vez que, inicialmente, o varrimento de potencial é feito numa direção e, posteriormente, no sentido oposto enquanto a intensidade da corrente é medida [46].

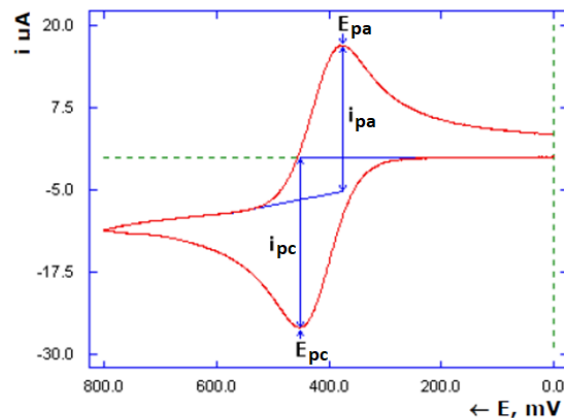


Figura 2.10: Exemplo de um voltamograma cíclico para um sistema redox reversível ($O + ne^- \leftrightarrow R$). Adaptada de [44].

Como se pode observar na Figura 2.10, o sistema redox ilustrado é reversível. O varrimento do potencial aplicado para valores mais positivos conduz à oxidação do composto em solução, gerando um pico de corrente i_{pa} (intensidade de pico anódico). No varrimento em sentido inverso (para potenciais mais negativos), ao tratar-se de uma reação reversível, surgirá um novo pico, um pico de redução, i_{pc} (intensidade de pico catódico), que resulta da redução dos produtos previamente oxidados e que se localizam na superfície do eletrodo. A intensidade máxima dos picos anódico e catódico pode ser medida nos potenciais E_{pa} (potencial de pico anódico) e E_{pc} (potencial de pico catódico), respetivamente [44].

2.4.2. Voltametria de Varrimento Linear

No mais simples método voltamétrico, o potencial no WE pode variar no sentido anódico ou catódico, registando-se a intensidade de corrente correspondente, de modo a fornecer um voltamograma. Assim, é possível afirmar que a LSV coincide com a CV quando o varrimento é efetuado apenas num dos sentidos e, portanto, os princípios descritos anteriormente para a CV aplicam-se igualmente para esta técnica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material e Equipamento

Durante a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- ✓ Balança analítica Mettler Toledo, com precisão de 0,00001g
- ✓ Medidor de pH Crison 2002
- ✓ Agitador magnético VWR VMS-C7
- ✓ Tubos Eppendorf
- ✓ Agitador VWR Analog Vortex Mixer
- ✓ Agitador VWR VV3
- ✓ Suporte magnético ThermoFisher Scientific (DynaMag™-2)
- ✓ Ímanes
- ✓ Micropipetas eppendorf Research plus
- ✓ Eléttodos serigrafados de carbono (SPCEs) DropSens (Ref: DRP-110, Lotes E0020871 e E0021503). Os SPCEs utilizados como transdutores do imunoensaio apresentam três eléctrodos (WE, RE, CE) serigrafados sobre um substrato cerâmico de dimensões 3,4 x 1,0 x 0,05 cm. Os contactos eléctricos e o RE são feitos de tinta de prata. Os WE e CE são feitos de tinta de carbono, sendo que o primeiro apresenta uma forma circular com um diâmetro de 4 mm [47].
- ✓ Potencióstato Metrohm Autolab PGSTAT101 com o software NOVA 1.10 versão 1.9
- ✓ Material de vidro classe A

3.2. Reagentes e Soluções

3.2.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich: hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), etanolamina, albumina de soro bovino (BSA), IgG anti-rato (molécula inteira) conjugado com biotina (anti-IgG-biotina), sal dissódico de 3-indoxil fosfato (3-IP) e nitrato de magnésio hexaidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$). As partículas magnéticas

funcionalizadas com ácido carboxílico (Dynabeads™ MyOne™), a cistatina C recombinante humana, a estreptavidina conjugada com a fosfatase alcalina (STR-ALP) 1,5 mg/mL, o nitrato de prata (AgNO_3) e o cloreto de sódio (NaCl) foram comercializados pela Thermo Fisher Scientific. O anticorpo monoclonal anti-cistatina C humana (anticorpo de captura) e o anticorpo monoclonal biotinilado anti-cistatina C humana (anticorpo de deteção) foram comprados à R&D Systems. O tween 20, o hidróxido de sódio (NaOH), o dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o hidrogenofosfato dissódico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos à Merck. Por fim, o ácido clorídrico (HCl) foi comprado à Fluka e o ácido nítrico (HNO_3) foi comercializado à AppliChem Panreac.

As amostras de soro utilizados foram de dois pacientes com DRC do Serviço de Nefrologia do Centro Hospitalar do Porto. A comissão de ética do Centro Hospitalar do Porto aprovou o protocolo do estudo. Os pacientes participaram no estudo após consentimento informado, respeitando os seus direitos de privacidade.

3.2.2. Soluções

Todas as soluções utilizadas no procedimento experimental foram preparadas com água ultrapura (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$), obtida através de um sistema de purificação da Millipore (Simplicity 185).

As soluções tampão necessárias para os ensaios efetuados foram as seguintes:

- ✓ 15 mM de ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico, ácido 4-morfolinoetanossulfónico (MES), pH 6
- ✓ 10 mM de tampão fosfato salino (PBS), pH 8
- ✓ 50 mM de tris(hidroximetil)aminometano, pH 7,4 ajustado com HCl (Tris- HCl)
- ✓ 0,1 M de tris(hidroximetil)aminometano, pH 7,4 ajustado com HNO_3 (Tris- HNO_3 pH 7,4)
- ✓ 0,1 M de tris(hidroximetil)aminometano com 2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, pH 7,4 ajustado com HNO_3 (Tris- HNO_3 com 2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 7,4)
- ✓ 0,1 M de tris(hidroximetil)aminometano com 20 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, pH 9,8 ajustado com HNO_3 (Tris- HNO_3 com 20 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 9,8)

A solução de EDC/NHS foi preparada em água ultrapura. Na solução de anticorpo de captura foi utilizado o tampão MES. Para a preparação da etanolamina foi

utilizada a solução tampão PBS. Os reagentes BSA 0,1%, BSA 2% do procedimento analítico II, anti-IgG-biotina e STR-ALP também do procedimento analítico II foram preparados com Tris-HCl. As soluções de BSA 2% do procedimento analítico III, cistatina C e anticorpo de deteção foram preparadas em tampão Tris-HNO₃ pH 7,4. Para a preparação da STR-ALP do procedimento analítico III foi utilizada a solução tampão Tris-HNO₃ com 2 mM Mg(NO₃)₂ pH 7,4. A solução de substrato enzimático que continha 5,0 mM de 3-IP e 2,0 mM de nitrato de prata no procedimento analítico II e 1,0 mM de 3-IP e 0,4 mM de nitrato de prata no procedimento analítico III foi preparada em Tris-HNO₃ com 20 mM Mg(NO₃)₂ pH 9,8 e armazenada em tubos opacos a 4 °C. Todas estas soluções foram preparadas diariamente.

3.3. Procedimento Analítico

O procedimento analítico incluiu, inicialmente, (I) a ativação e acoplamento do anticorpo de captura (CAb) às MBs, através da ligação covalente entre os grupos amina do anticorpo (-NH₂) e os grupos carboxílicos (-COOH) presentes nas partículas. Seguidamente, procedeu-se (II) à verificação da modificação das MBs utilizando um anti-IgG-biotina que reconhece o CAb. Posteriormente, realizou-se (III) o imunoensaio formato “sanduíche” completo com as MBs-CAb, analito (CysC) e anticorpo de deteção (DAb).

I. Ligação do CAb às MBs

Para a ativação e modificação das MBs com o CAb, aplicou-se o seguinte procedimento:

1. Agitou-se a suspensão stock de MBs (10 mg/mL).
2. Transferiu-se 10 µL de MBs para tubos Eppendorf de 0,5 mL.
3. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
4. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e incubaram-se as MBs com 100 µL de MES durante 5 minutos.
5. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
6. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 µL de MES.

7. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
8. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 50 μL de MES e 50 μL de EDC/NHS 50 mg/mL, para ativação e estabilização dos grupos carboxílicos presentes nas MBs, e agitou-se durante 30 minutos.
9. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
10. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, adicionaram-se 75 μL de CAb e agitou-se durante 120 minutos.
11. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
12. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e incubaram-se as MBs-CAb com 100 μL de etanolamina 50 mM durante 60 minutos de modo a bloquear os grupos carboxílicos ativos e livres.
13. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
14. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 μL de Tris-HCl.
15. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
16. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs-CAb em 100 μL de BSA 0,1% e armazenou-se no frigorífico.

II. Verificação da Imobilização do CAb nas MBs utilizando um Anti-IgG Biotinilado

De modo a verificar o acoplamento do CAb às MBs, aplicou-se o seguinte procedimento:

1. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
2. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 50 μL de Tris-HCl.
3. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.

4. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e incubaram-se as MBs-CAb com 50 μ L de BSA 2% durante 30 minutos.
5. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
6. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 50 μ L de Tris-HCl.
7. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
8. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 50 μ L de anti-IgG-biotina e agitou-se durante 60 minutos.
9. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
10. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 50 μ L de Tris-HCl.
11. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
12. Repetiram-se os pontos 10 e 11 do procedimento.
13. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 50 μ L da enzima STR-ALP e agitou-se durante 30 minutos.
14. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
15. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 50 μ L de Tris-HNO₃ com 20 mM Mg(NO₃)₂ pH 9,8.
16. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
17. Repetiram-se os pontos 15 e 16 do procedimento.
18. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e suspenderam-se as MBs em 40 μ L de Tris-HNO₃ com 20 mM Mg(NO₃)₂ pH 9,8.
19. Colocaram-se os 40 μ L das MBs suspensas em Tris-HNO₃ com 20 mM Mg(NO₃)₂ pH 9,8 no SPCE, no qual foi imobilizado um íman por baixo do WE para a atração das MBs.
20. Após 3 minutos, adicionaram-se 10 μ L de substrato enzimático (3-IP/Ag⁺) no WE.
21. Após 20 minutos de reação enzimática, mediu-se o sinal de acordo com os seguintes parâmetros:

Técnica: voltametria de varrimento linear

E_i : + 0,0 V

E_f : + 0,35 V

E_{step} : 5 mV

Velocidade de varrimento: 50 mV/s

III. Ensaio para Detecção da Cistatina C

Para a realização dos imunoenaios com o intuito de detetar a CysC, aplicou-se o seguinte procedimento analítico:

1. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
2. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, adicionaram-se 100 μ L de Tris-HNO₃ pH 7,4 e agitou-se durante 2 minutos.
3. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
4. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e incubaram-se as MBs-CAb com 100 μ L de BSA 2% durante 30 minutos.
5. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
6. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 μ L de Tris-HNO₃ pH 7,4.
7. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
8. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 75 μ L de CysC e agitou-se durante 60 minutos.
9. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
10. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 μ L de Tris-HNO₃ pH 7,4 com 0,01% de tween 20.
11. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
12. Repetiram-se os pontos 10 e 11 do procedimento.

13. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 75 μL de DAb e agitou-se durante 60 minutos.
14. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
15. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 μL de Tris- HNO_3 com 2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 7,4 e 0,01% de tween 20.
16. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
17. Repetiram-se os pontos 15 e 16 do procedimento.
18. Retiraram-se os tubos do suporte magnético, suspenderam-se as MBs em 75 μL da enzima STR-ALP e agitou-se durante 30 minutos.
19. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
20. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e adicionaram-se 100 μL de Tris- HNO_3 com 20 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 9,8.
21. Colocaram-se os tubos no suporte magnético por 2 minutos e removeu-se o sobrenadante.
22. Repetiram-se os pontos 20 e 21 do procedimento.
23. Retiraram-se os tubos do suporte magnético e suspenderam-se as MBs em 130 μL de Tris- HNO_3 com 20 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 9,8.
24. Colocaram-se 40 μL das MBs suspensas em Tris- HNO_3 com 20 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ pH 9,8 no SPCE, no qual foi imobilizado um íman por baixo do WE para a atração das MBs.
25. Após 3 minutos, adicionaram-se 10 μL de substrato enzimático (3-IP/ Ag^+) no WE.
22. Após 20 minutos de reação enzimática, mediu-se o sinal de acordo com os seguintes parâmetros:

Técnica: voltametria de varrimento linear

E_i : + 0,0 V

E_f : + 0,35 V

E_{step} : 5 mV

Velocidade de varrimento: 50 mV/s

3.4. Representação Esquemática do Imunoensaio

Para uma melhor compreensão do procedimento analítico efetuado, apresenta-se, na Figura 3.1, o esquema do imunoensaio desenvolvido para a deteção da CysC e, consequentemente, para o diagnóstico precoce da DRC.

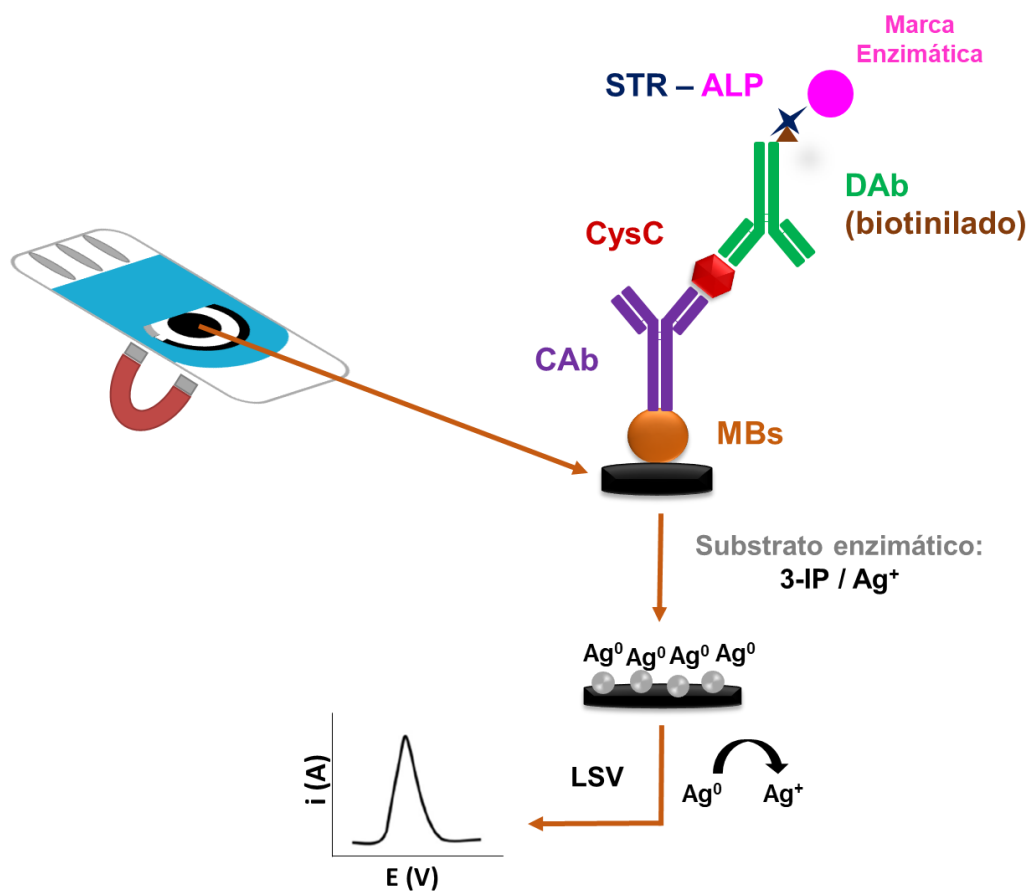


Figura 3.1: Representação esquemática do imunoensaio desenvolvido para o diagnóstico da DRC.

4. Resultados e Discussão

Para registar a interação entre o antigénio e os anticorpos de captura e deteção, através de um imunoensaio de formato “sanduíche”, utilizou-se a enzima fosfatase alcalina (conjugada com estreptavidina) como marca enzimática. Através da forte ligação estreptavidina-biotina, o anticorpo de deteção biotilado foi reconhecido pela biomarca utilizada. Tal como descrito no subcapítulo 2.3.2., a reação enzimática conduz à redução e deposição da prata presente em solução na superfície do SPCE. Assim, através da redissolução voltamétrica da prata depositada na etapa da reação enzimática obteve-se uma resposta eletroquímica que estava, desse modo, correlacionada com a concentração de analito. Portanto, a intensidade de corrente do pico resultante é a medida analítica para avaliar aquela interação. Na Figura 4.1 evidencia-se um exemplo de um voltamograma de varrimento linear obtido nestes imunoenaios.

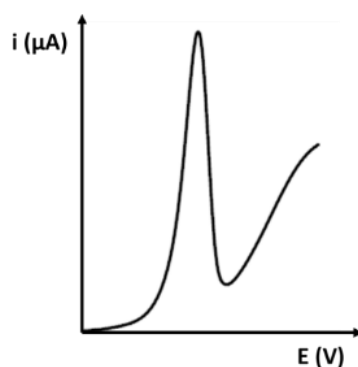


Figura 4.1: Exemplo de um voltamograma de varrimento linear típico destes imunoenaios.

4.1. Otimização do Protocolo de Modificação das MBs com o CAb

A otimização dos procedimentos analíticos consistiu, inicialmente, na verificação da ligação covalente entre o CAb e as MBs. De seguida, procedeu-se à otimização do bloqueio dos grupos -COOH das MBs. Ainda no âmbito da otimização do protocolo, avaliou-se a estabilidade das MBs-CAb quando armazenadas durante uma semana. E, por fim, analisou-se a resposta da superfície sensora desenvolvida na deteção do analito (CysC).

4.1.1. Verificação da Ligação do CAb às MBs

De modo a verificar a modificação das MBs com CAb utilizou-se um anticorpo, biotiniado, que reconhece outras IgG (anti-IgG-biotina) e avaliou-se a interação do mesmo com o CAb ($10 \mu\text{g/mL}$) imobilizado na superfície das MBs. Como controlo negativo do ensaio utilizaram-se MBs não modificadas com CAb ($0 \mu\text{g/mL}$). A STR-ALP foi utilizada como marca enzimática, reconhecendo o anti-IgG-biotina através da interação estreptavidina-biotina. A estreptavidina tem a capacidade de se ligar a quatro moléculas de biotina, as quais ao estarem, normalmente, conjugadas a uma enzima, anticorpo ou proteína alvo para formar o complexo estreptavidina-biotina, tornam esta interação ideal para estratégias de deteção [48]. Na Figura 4.2, apresentam-se os resultados obtidos.

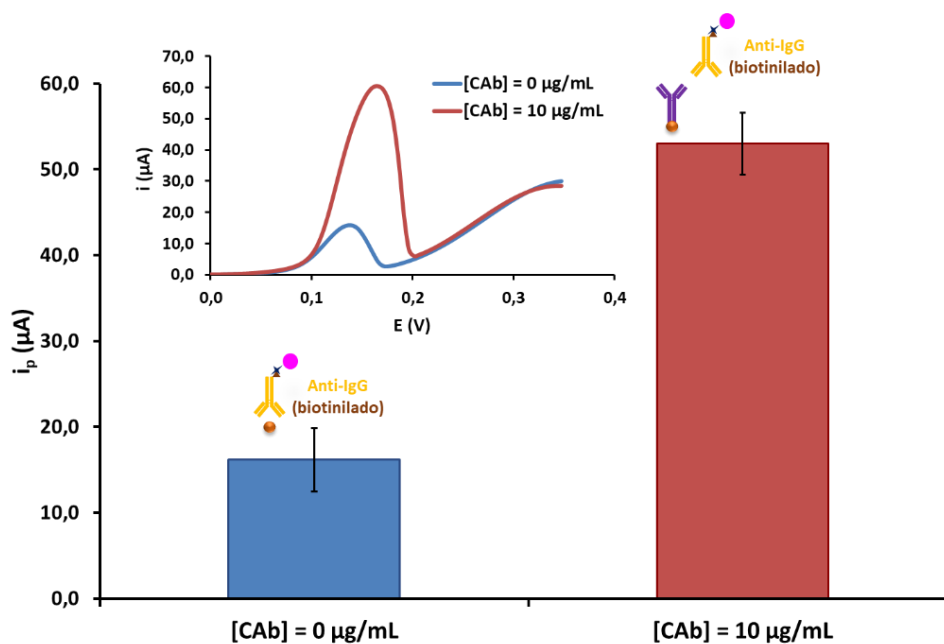


Figura 4.2: Representação gráfica dos resultados obtidos para verificação da modificação das MBs com CAb. Parâmetros experimentais: CAb $0 \mu\text{g/mL}$ e $10 \mu\text{g/mL}$; anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Por observação dos resultados apresentados na Figura 4.2 confirmou-se que o sinal obtido na presença de MBs modificadas com CAb é superior à resposta obtida com as MBs não modificadas. Deste modo, a interação entre os anticorpos anti-IgG-biotina e CAb (IgG) certificou que o protocolo desenvolvido para a ligação covalente das MBs ao CAb (protocolo I) é adequado.

4.1.2. Otimização do Bloqueio dos Grupos Carboxílicos das MBs

Uma vez corroborado o protocolo de modificação das MBs com o elemento de biorechecimento do analito, levou-se a cabo um imunoenensaio para avaliar dois métodos de bloqueio dos grupos carboxílicos das MBs que se encontravam livres após a etapa de conjugação com o CAb. Neste sentido, durante este ensaio, testou-se o efeito de dois reagentes bloqueantes no sinal analítico: o bloqueio com etanolamina 50 mM durante 1 hora foi comparado com duas incubações sucessivas (10 minutos cada) das MBs em solução tampão Tris-HCl pH 7,4 com 0,1% de Tween 20 e 0,5% de BSA. Na Figura 4.3 estão representados os resultados obtidos, na qual também se incluiu a razão entre o sinal de interesse analítico e o branco (S/B).

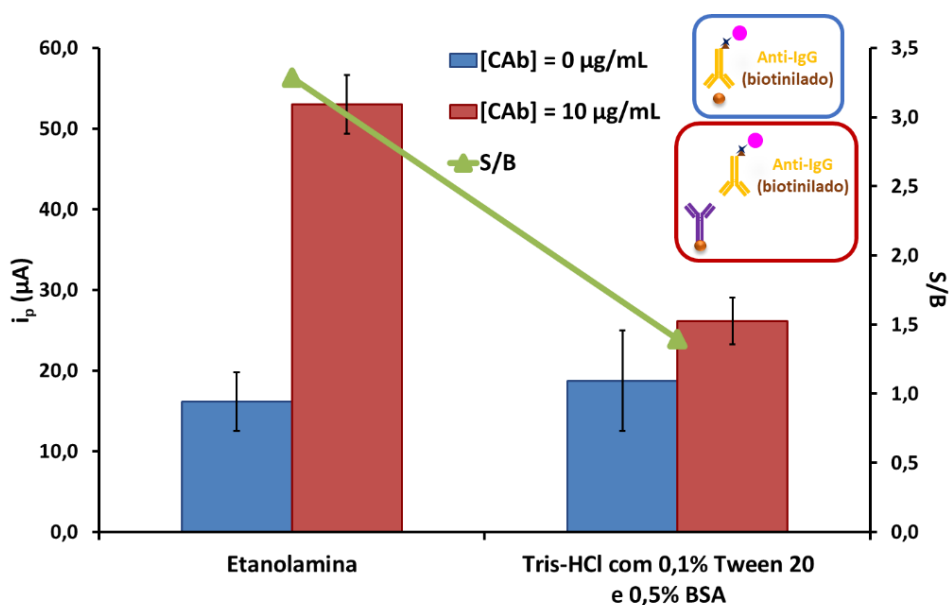


Figura 4.3: Representação gráfica dos resultados obtidos para otimização do bloqueio dos grupos -COOH das MBs. Parâmetros experimentais: CAb 0 µg/mL e 10 µg/mL; anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Através dos dados representados na Figura 4.3, verificou-se que, aquando do bloqueio dos grupos carboxílicos das MBs com etanolamina, a S/B foi bastante superior à obtida utilizando Tris-HCl com 0,1% de Tween 20 e 0,5% de BSA. Com efeito, para prosseguir os estudos optou-se pelo bloqueio dos grupos -COOH das MBs com etanolamina 50 mM.

4.1.3. Avaliação da Estabilidade das MBs-CAb

De forma a avaliar a estabilidade das MBs modificadas com CAb, procedeu-se à realização de dois ensaios, usando o protocolo II; um no dia seguinte à ligação do CAb às MBs (dia 0) e outro 1 semana após a modificação das MBs (armazenadas a 2-8 °C). Na Figura 4.4 apresentam-se os resultados obtidos.

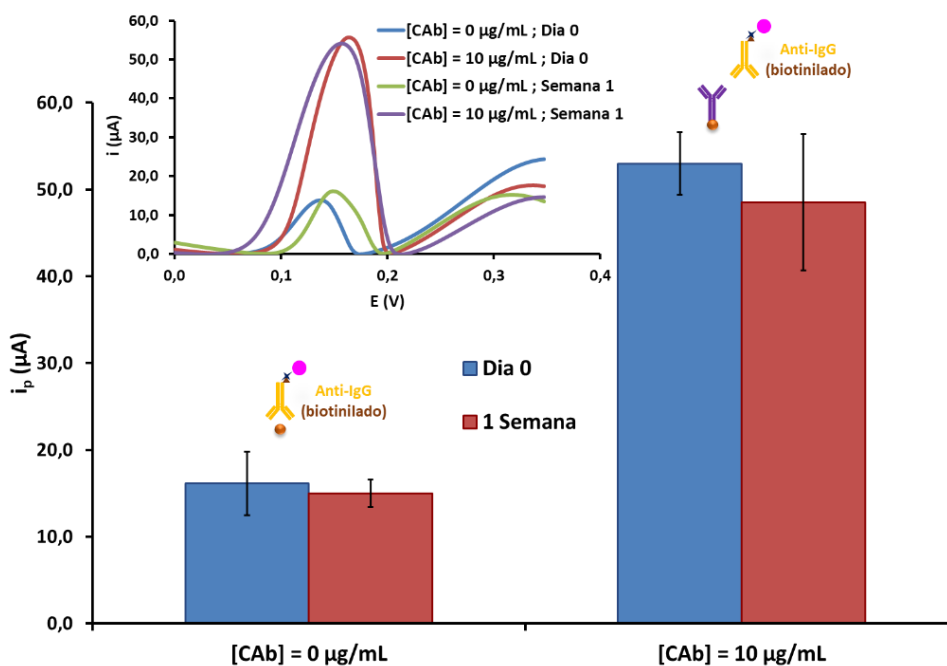


Figura 4.4: Representação gráfica dos resultados da avaliação da estabilidade das MBs-CAb. Parâmetros experimentais: CAb 0 µg/mL e 10 µg/mL; anti-IgG-biotina 1:10 000; STR-ALP 1:300 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

De acordo com os resultados evidenciados na Figura 4.4, verificou-se que as MBs modificadas com o CAb se mantêm estáveis durante 1 semana.

4.1.4. Aplicação do Ensaio na Detecção da CysC

Uma vez comprovada a ligação do CAb à superfície das MBs, assim como o melhor agente bloqueante para o referido protocolo e a estabilidade dos mesmos, procedeu-se ao desenvolvimento do imunoenensaio para a deteção de CysC. Para completar o imunocomplexo, de tipo “sanduíche” entre o antigénio e os anticorpos, utilizou-se um anticorpo, biotinilado, que reconhece o analito e avaliou-se a interação do mesmo com a CysC (300 ng/mL) ligada ao CAb, imobilizado nas MBs, usando o

procedimento analítico III. À semelhança do ensaio com anti-IgG, a STR-ALP foi utilizada como marca enzimática, reconhecendo o DAb através da interação estreptavidina-biotina. Como controlo negativo do ensaio não se incubou as MBs-CAB com analito (0 ng/mL CysC). Adicionalmente, e de modo a tornar o ensaio mais eficiente e “*user-friendly*”, avaliou-se a possibilidade de acoplar o CAB às MBs em quantidade superior, comparando a intensidade da corrente quando os ensaios das diferentes réplicas são efetuados em dois tubos em separado ($n=1/\text{tubo}$) e quando o mesmo imunoensaio é realizado no mesmo tubo ($n=2/\text{tubo}$) e, posteriormente, a solução é colocada, de modo proporcional, em dois SPCEs. Na Figura 4.5 estão apresentados os resultados obtidos.

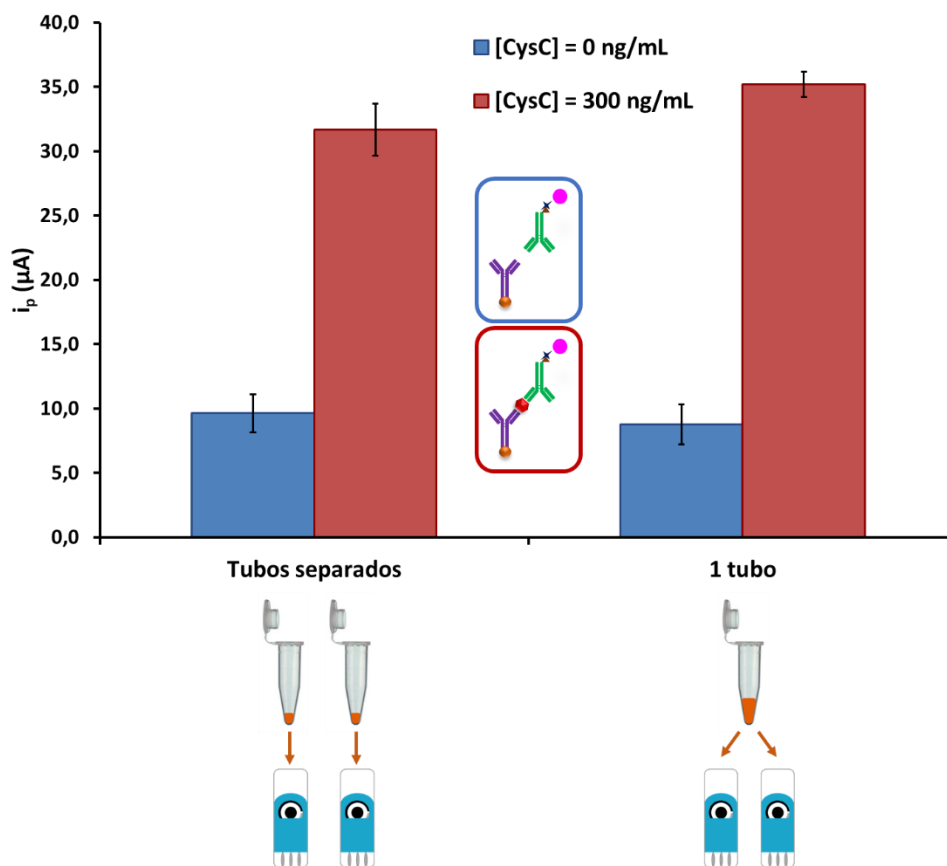


Figura 4.5: Representação gráfica dos resultados da resposta do imunoensaio à CysC quando o mesmo é efetuado em tubos separados e no mesmo tubo. Parâmetros experimentais: CAB 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

A partir dos resultados evidenciados na Figura 4.5 confirmou-se que há uma diferença significativa entre o sinal de fundo (0 ng/mL de CysC) e o sinal analítico de

interesse, ou seja, na presença da CysC (300 ng/mL). Deste modo, a interação entre os anticorpos CAb e DAb e a CysC corroborou que o protocolo desenvolvido para a deteção do analito (protocolo III) é adequado. No que diz respeito à realização das réplicas dos imunoenaios em apenas um tubo eppendorf ou em tubos separados, verificou-se que os dados obtidos não apresentam diferenças significativas. Por isso, tendo em conta que a i_p registada é semelhante, é vantajoso efetuar o imunoenasão num só tubo eppendorf, uma vez que, desta forma, se garante que as MBs são sujeitas exatamente às mesmas condições, o que pode contribuir para uma melhor precisão dos resultados. Além disso, este procedimento permite diminuir o tempo experimental, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de um protocolo mais eficiente.

4.2. Avaliação da Biofuncionalidade do Imunoenasão

De modo a analisar as interações entre os diferentes biorreagentes envolvidos no imunoenasão, procedeu-se à realização de um ensaio onde se pretendeu verificar a interação entre o antígeno (CysC) e o(s) anticorpo(s) CAb e DAb (Figura 4.6).

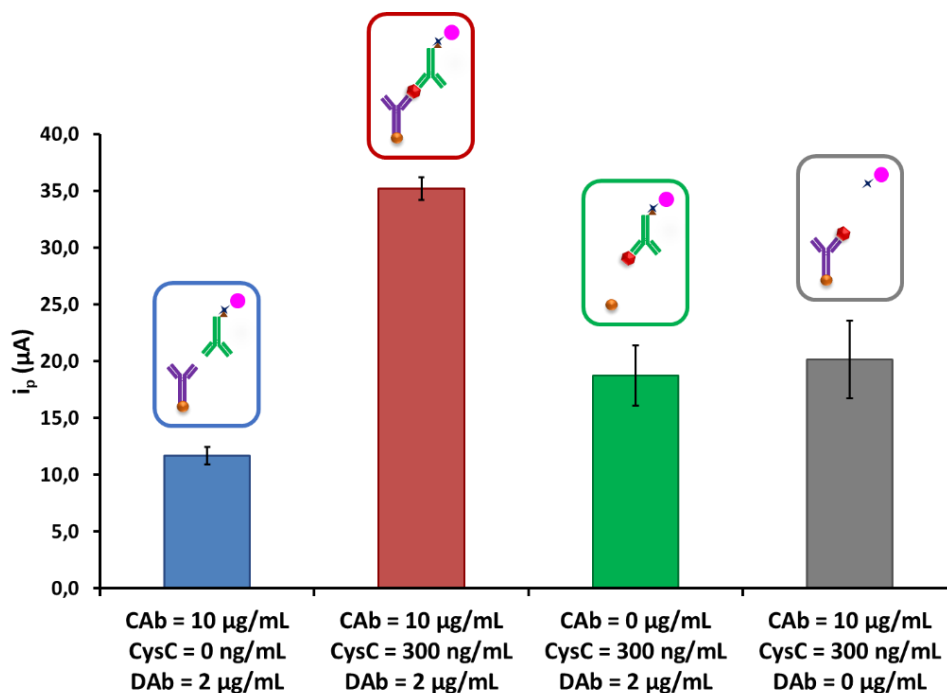


Figura 4.6: Representação gráfica dos resultados da avaliação da biofuncionalidade do imunoenasão. Parâmetros experimentais: CAb 0 µg/mL e 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 0 µg/mL e 2 µg/mL; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/Ag⁺ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

Por observação da Figura 4.6 concluiu-se que, para um ensaio “completo”, existe uma diferença significativa entre o sinal de fundo (0 ng/mL - barra azul) e o sinal de interesse analítico (300 ng/mL - barra vermelha). A partir da informação evidenciada nesta mesma figura verificou-se, ainda, que, na ausência de cada um dos dois elementos de bioreconhecimento (CAb e DAb) e na presença do analito (CysC), a intensidade da corrente resultante foi significativamente inferior à resposta obtida num imunoenensaio “completo” (barra vermelha), corroborando, assim, o correto funcionamento da interação específica entre o antigénio (CysC) e os anticorpos (CAb e DAb).

4.3. Otimização dos Parâmetros Experimentais

Uma vez verificado o funcionamento adequado e seletivo dos imunorreagentes selecionados para a deteção da CysC, procedeu-se à otimização das diferentes variáveis experimentais envolvidas no imunoenensaio. Deste modo, neste subcapítulo evidenciam-se os resultados obtidos na otimização dos parâmetros experimentais mais relevantes do imunoenensaio, nomeadamente o efeito da etapa de bloqueio, a concentração do CAb e do substrato enzimático e a concentração e tempo de incubação do DAb e da STR-ALP.

4.3.1. Avaliação da Etapa de Bloqueio

Inicialmente avaliou-se a necessidade da etapa de bloqueio com BSA 2% prévia à incubação da fase sensora com CysC (Figura 4.7). Este bloqueio, que consiste na incubação das MBs-CAb numa solução de BSA 2% durante 30 minutos, melhorou o imunoenensaio, uma vez que a S/B é muito superior à obtida na ausência desta mesma etapa. Assim, verificou-se que esta etapa de bloqueio com BSA se deve manter no imunoenensaio de modo a minimizar as adsorções não específicas.

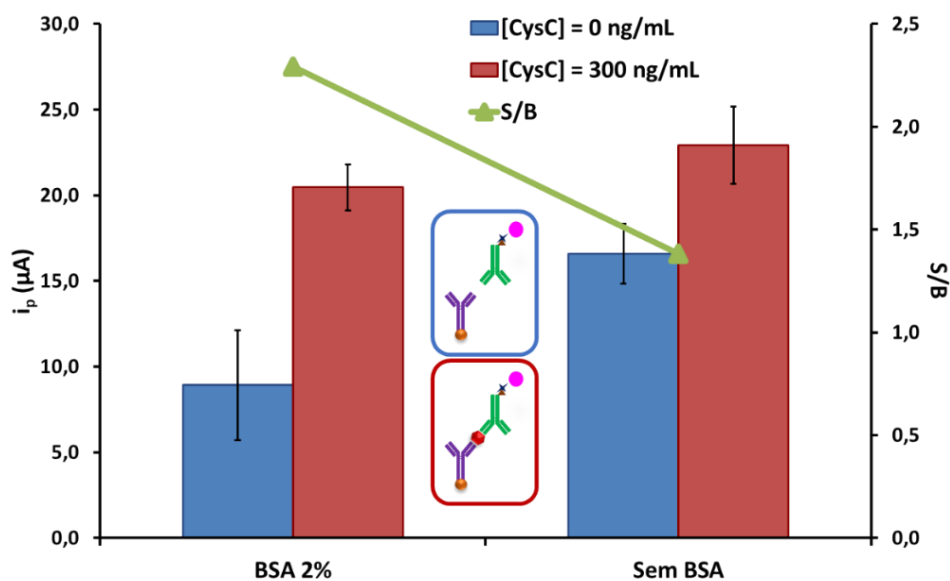


Figura 4.7: Representação gráfica dos resultados obtidos para avaliação da etapa de bloqueio com BSA referida no procedimento III. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu g/mL$; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 $\mu g/mL$; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/ Ag^+ 5 mM / 2 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

4.3.2. Otimização da Concentração do Substrato Enzimático (3-IP/ Ag^+)

Para a otimização da concentração do substrato enzimático avaliaram-se duas concentrações distintas do substrato a utilizar. Neste sentido, estudaram-se duas misturas com diferentes concentrações dos dois reagentes: a) 5 mM de 3-IP / 2 mM de Ag^+ e b) 1 mM de 3-IP / 0,4 mM de Ag^+ . Na Figura 4.8 representam-se os voltamogramas resultantes.

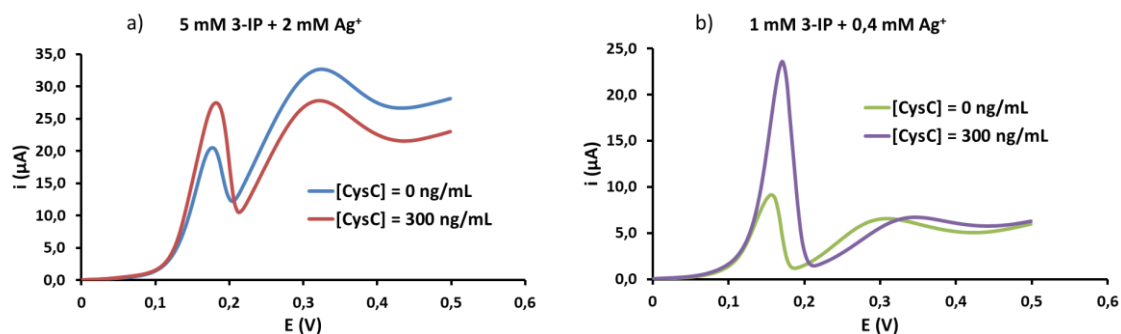


Figura 4.8: Voltamogramas (LSV) resultantes do imunoensaio para otimização da concentração do substrato enzimático. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu g/mL$; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAb 2 $\mu g/mL$; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/ Ag^+ 5 mM / 2 mM e 1 mM / 0,4 mM.

Os voltamogramas registados na Figura 4.8 demonstram que o pico resultante da redissolução da prata é melhor definido quando a concentração de substrato enzimático é menor (1 mM de 3-IP e 0,4 mM de Ag^+). Embora, na situação b), a i_p obtida seja inferior, possivelmente devido à menor quantidade de prata disponível para reoxidar, não se denotou a interferência considerável do sinal de oxidação do 3-IP no pico de reoxidação da prata metálica. Para estes ensaios, o potencial final da LSV foi, exceccionalmente, + 0,5 V, de modo a ser possível observar o pico de oxidação do 3-IP que começa a aproximadamente a + 0,2 V e tem o máximo por volta de + 0,30 V / + 0,35 V.

No sentido de comparar melhor estes resultados, organizaram-se os dados num gráfico de barras, no qual se incluiu também a S/B (Figura 4.9).

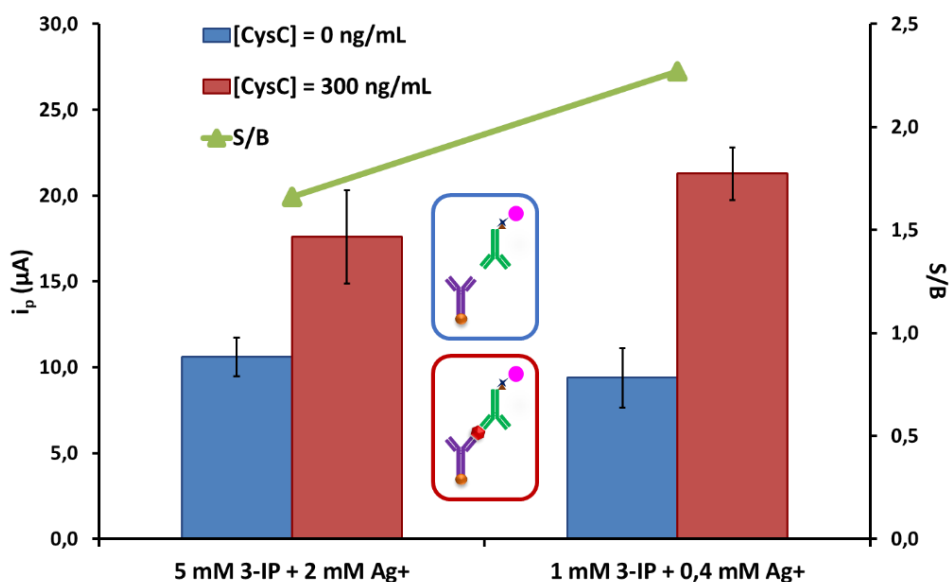


Figura 4.9: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do substrato enzimático. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 300 ng/mL; DAB 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:600 000 e 3-IP/ Ag^+ 5 mM / 2 mM e 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Através da Figura 4.9 concluiu-se que, de facto, a concentração de substrato enzimático que maximiza a S/B é a de 1 mM de 3-IP e 0,4 mM de nitrato de prata. Neste sentido optou-se por efetuar os restantes imunoenaios com estas concentrações.

4.3.3. Otimização da Concentração da Enzima (STR-ALP)

Os resultados obtidos nos ensaios anteriores sugerem que, apesar do bloqueio com etanolamina e BSA, persistem adsorções não específicas que se traduzem em sinais de branco elevados. Um dos fatores que poderá ter um papel mais relevante para esse efeito é a concentração de STR-ALP. Assim, de modo a minimizar aquelas interações não específicas e melhorar a S/B procedeu-se a um estudo preliminar de otimização da concentração da enzima e estudaram-se três fatores de diluição da mesma (1:300 000, 1:600 000 e 1:1 200 000). Neste ensaio utilizou-se a concentração de substrato enzimático otimizada (1 mM de 3-IP e 0,4 mM de Ag⁺) e uma concentração de CysC de 100 ng/mL, uma vez que não se verificou uma diferença significativa entre este valor e 300 ng/mL. Na Figura 4.10 evidenciam-se os resultados do imunoensaio.

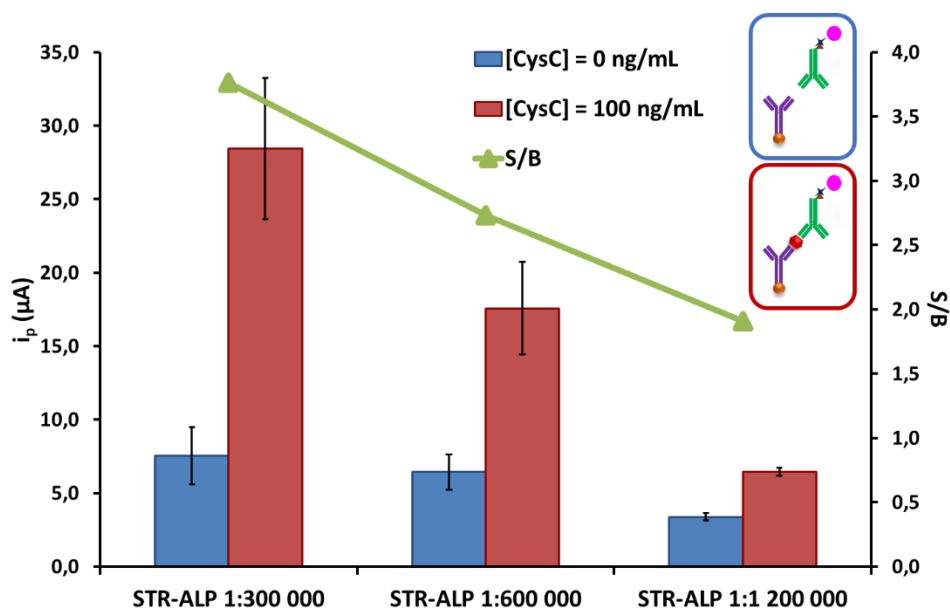


Figura 4.10: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:300 000, 1:600 000 e 1:1 200 000 e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

De acordo com os resultados evidenciados na Figura 4.10, concluiu-se que o fator de diluição de enzima que maximiza a S/B é de 1:300 000. Assim, esta foi a diluição selecionada, inicialmente, para prosseguir os ensaios de otimização.

Com o intuito de diminuir o sinal de fundo avaliou-se se a adição de BSA na etapa de incubação com a enzima favorecia o ensaio. Assim, compararam-se os

resultados obtidos num imunoensaio com STR-ALP 1:300 000 sem BSA, com 0,1% de BSA e com 0,5% de BSA (Figura 4.11).

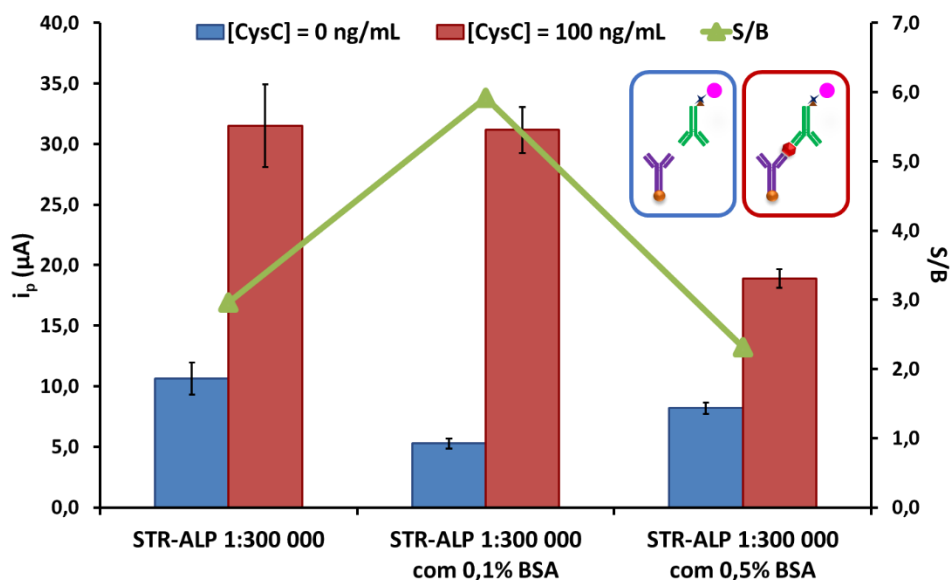


Figura 4.11: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da enzima. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:300 000, 1:300 000 com 0,1% de BSA e 1:300 000 com 0,5% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Por observação dos resultados apresentados na Figura 4.11, verificou-se que adicionar BSA à enzima melhorou o resultado do imunoensaio, no entanto a partir de determinada concentração deste bloqueante o sinal de interesse analítico (100 ng/mL de CysC) é significativamente afetado, prejudicando, assim, a S/B. Neste sentido, o fator de diluição de STR-ALP selecionado foi o de 1:300 000 com 0,1% de BSA.

Tendo em consideração os resultados apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11, procedeu-se à análise da resposta do imunoensaio quando se diminuiu a diluição de STR-ALP para 1:100 000 também com 0,1% de BSA e compararam-se estes dados com os obtidos com a diluição de 1:300 000 (Figura 4.12).

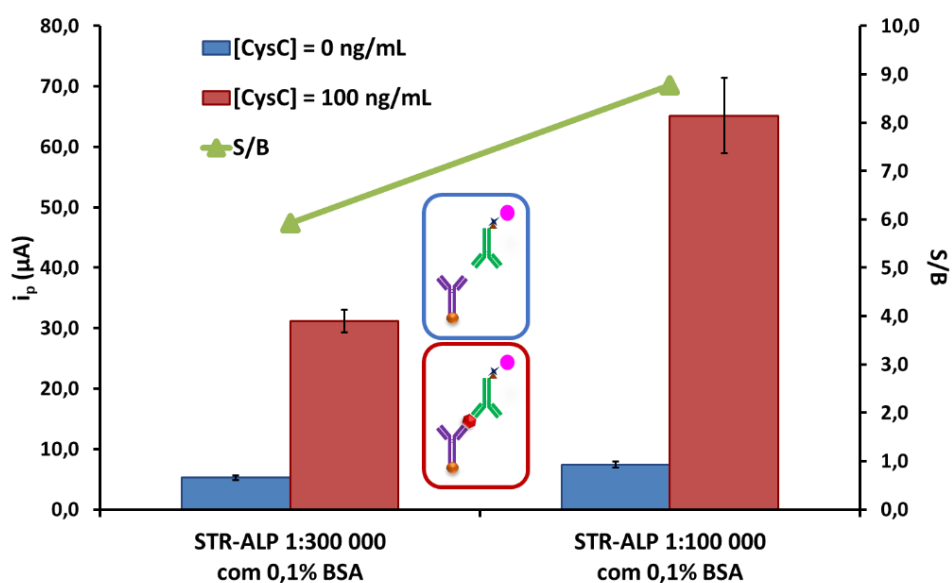


Figura 4.12: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 100 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:300 000 com 0,1% de BSA e 1:100 000 também com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Através da Figura 4.12 comprovou-se que o aumento da quantidade da enzima favorece o imunoensaio, razão pela qual se optou por efetuar os restantes ensaios com o fator de diluição de STR-ALP de 1:100 000 com 0,1% de BSA. No entanto, para a otimização deste parâmetro foi necessário averiguar a concentração de enzima onde se maximiza a S/B. Para esse efeito é necessário estabelecer também a concentração de enzima a partir da qual a S/B satura e/ou diminui. Os resultados apresentados no ponto 4.3.2. foram fundamentais para melhorar a S/B e reduzir a contribuição de adsorções não específicas da enzima devido a uma concentração excessiva. No entanto, o estudo de otimização final da concentração de STR-ALP foi novamente efetuado após a otimização da concentração do CAb e da concentração e tempo de incubação do DAB (resultados apresentados no subcapítulo 4.3.6).

4.3.4. Otimização da Concentração do CAb

Uma vez minimizadas as interações não específicas e melhorada a S/B, avaliou-se a possível gama de linearidade do ensaio, tendo-se estabelecido uma concentração de CysC de 25 ng/mL para prosseguir a otimização dos parâmetros experimentais. Neste sentido, para a otimização da concentração do CAb estudaram-se três

concentrações de anticorpo: 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, sendo que se utilizaram as concentrações otimizadas da enzima e do substrato enzimático. Na Figura 4.13, representam-se os resultados obtidos.

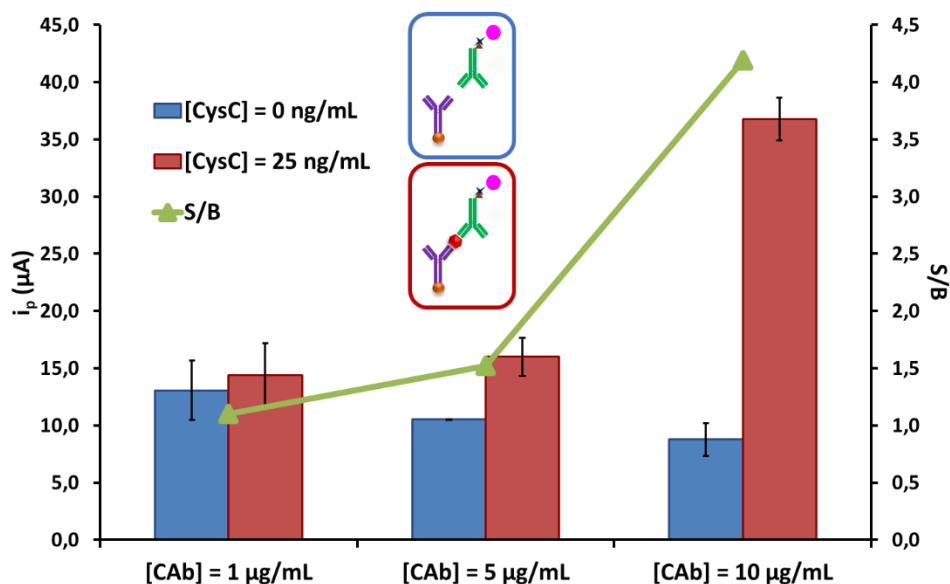


Figura 4.13: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do CAB. Parâmetros experimentais: CAB 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.13, confirmou-se que se deve manter a concentração de CAB de 10 $\mu\text{g/mL}$, pois é esta que potencia a S/B. À semelhança do que foi referido para a concentração de STR-ALP, para otimizar este parâmetro analítico deveria ser efetuado o mesmo ensaio com uma concentração de CAB superior de modo a verificar se esta variação beneficiava o imunoensaio, no entanto isto não foi possível devido à quantidade disponível de CAB, pelo que se optou por manter a concentração máxima de CAB testada (10 $\mu\text{g/mL}$) nos estudos seguintes.

4.3.5. Otimização da Concentração e do Tempo de Incubação do DAb

De modo a otimizar a concentração do DAb, estudaram-se três concentrações de anticorpo: 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$. Este imunoensaio foi efetuado com as concentrações otimizadas do CAB, da enzima e do substrato enzimático e utilizou-se a concentração de 25 ng/mL de CysC, pela razão previamente descrita. Na Figura 4.14 organizaram-se os dados obtidos.

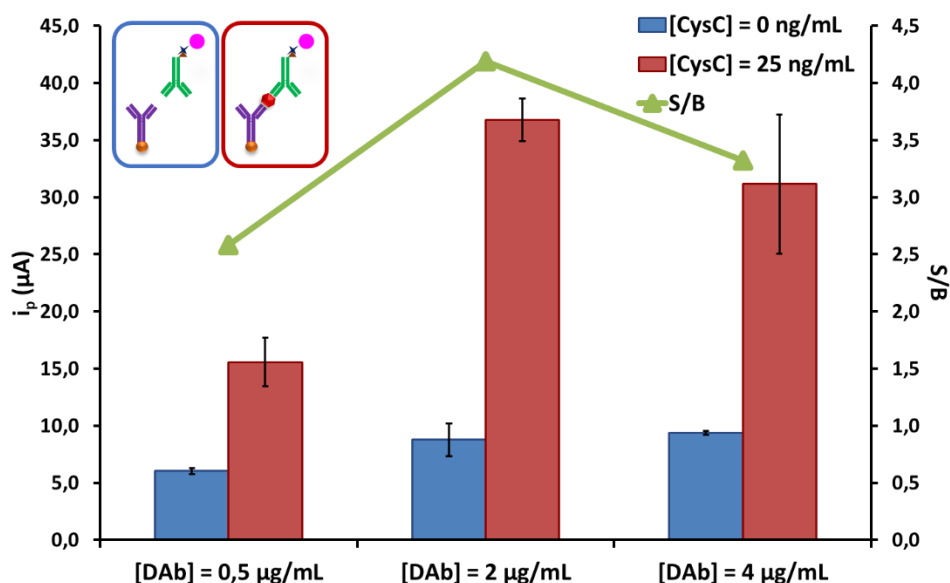


Figura 4.14: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração do DAb. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 0,5 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

A partir da informação apresentada na Figura 4.14, certificou-se que se deve manter a concentração de DAb, uma vez que, tendo sido estudadas concentrações superior e inferior a esta, a melhor S/B se verificou para o imunoensaio com 2 µg/mL de DAb.

No sentido de otimizar o tempo de incubação do DAb analisaram-se os resultados obtidos quando se incuba este anticorpo durante 1 hora (tempo utilizado até aqui) e durante 30 minutos, de modo a verificar se é possível reduzir o tempo do ensaio, tal como se apresenta na Figura 4.15.

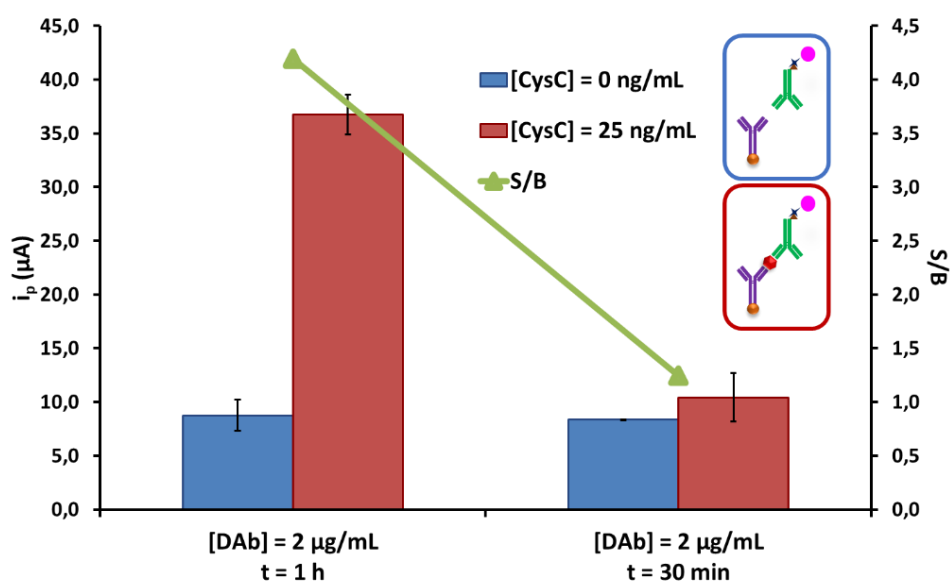


Figura 4.15: Representação gráfica dos resultados da otimização do tempo de incubação do DAb. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Tal como demonstrado na Figura 4.15, não foi possível reduzir o tempo de incubação do DAb, já que existe uma diferença muito acentuada no sinal analítico aquando da incubação do anticorpo durante 1 hora e durante 30 minutos. Tempos superiores a 1 hora não foram considerados uma vez que aumentariam consideravelmente o tempo de ensaio, o que se traduziria numa desvantagem significativa.

4.3.6. Avaliação da Otimização da Concentração da Enzima e Otimização do Tempo de Incubação da mesma

De acordo com o referido no subcapítulo 4.3.2, para otimizar a concentração de STR-ALP verificou-se a necessidade de averiguar se o aumento da concentração de enzima melhora a S/B. Neste sentido comparou-se a resposta do imunoensaio utilizando três diluições de STR-ALP: 1:500 000, 1:100 000 e 1:10 000, todas com 0,1% de BSA. Os resultados obtidos para a otimização deste parâmetro analítico são apresentados na Figura 4.16.

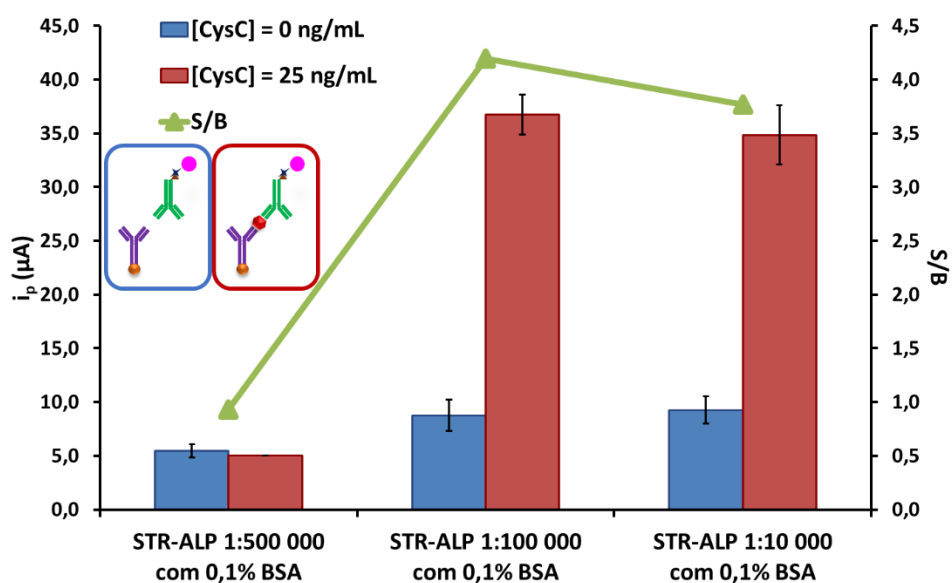


Figura 4.16: Representação gráfica dos resultados da otimização da concentração da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 µg/mL; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 µg/mL; STR-ALP 1:500 000, 1:100 000 e 1:10 000 todas com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

Com base na Figura 4.16, confirmou-se que se deve manter a quantidade de STR-ALP otimizada anteriormente, uma vez que, tendo sido estudadas uma diluição superior e outra inferior, é aquela que maximiza a S/B.

Com o intuito de otimizar o tempo de incubação da enzima analisaram-se os resultados obtidos quando se incubava a STR-ALP (1:100 000 com 0,1% de BSA) durante 30 minutos como até então e durante 15 minutos, de modo a verificar se é possível diminuir o tempo do ensaio, tal como se representa na Figura 4.17.

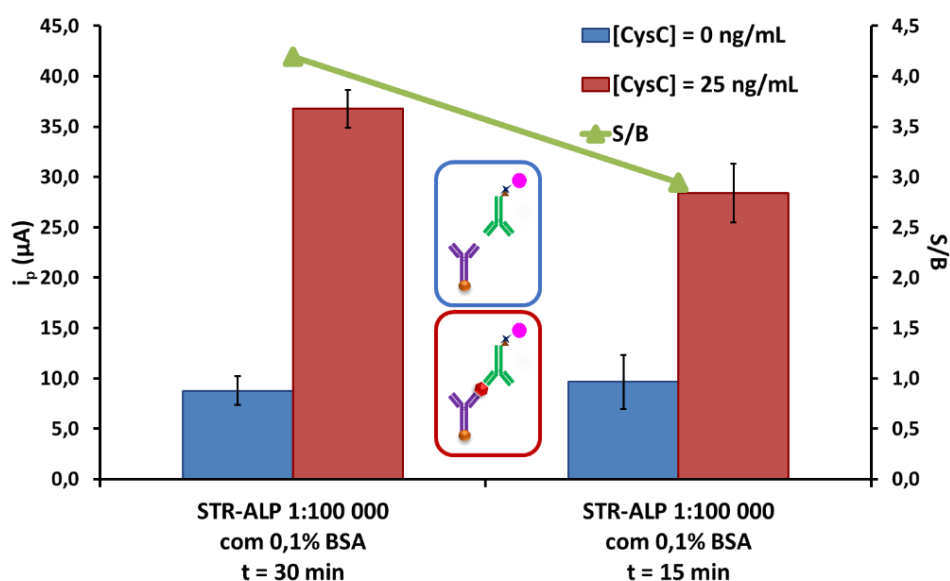


Figura 4.17: Representação gráfica dos resultados da otimização do tempo de incubação da STR-ALP. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL e 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/ Ag^+ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas repetições.

De acordo com os dados apresentados na Figura 4.17, um tempo de incubação de 15 min resultou num decréscimo da S/B. Neste sentido, concluiu-se que o tempo de incubação da enzima se deve manter em 30 minutos.

4.4. Curva de Calibração

De modo estabelecer a curva de calibração, procedeu-se à avaliação da resposta do imunoensaio desenvolvido a concentrações crescentes de CysC (5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 500 ng/mL) sob as condições experimentais previamente otimizadas: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$, DAb 2 $\mu\text{g/mL}$, STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/ Ag^+ 1 mM / 0,4 mM. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.18.

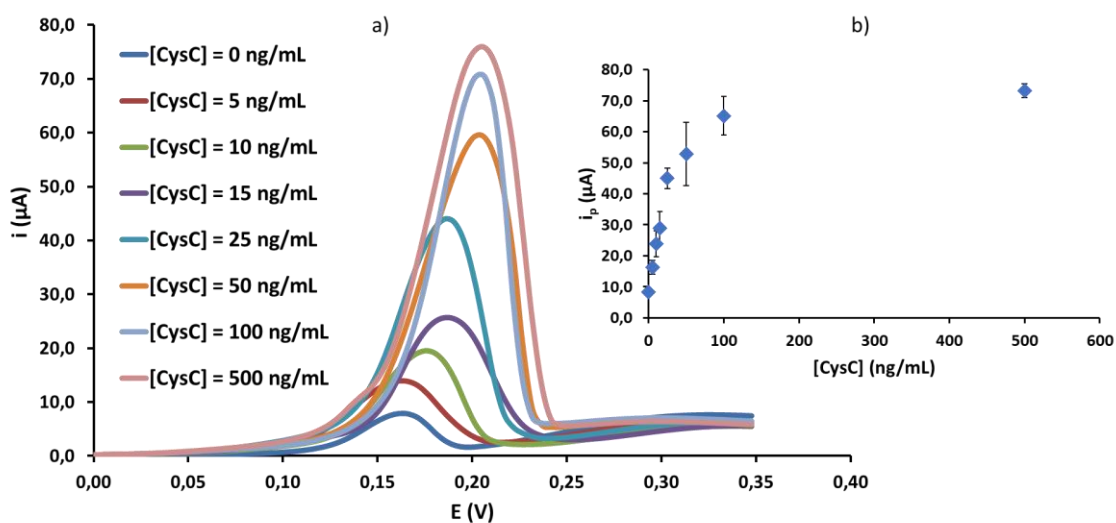


Figura 4.18: a) Voltamogramas típicos da resposta do imunoensaio a concentrações crescentes de CysC; b) Representação gráfica dos resultados da intensidade da corrente dos picos em função da concentração crescente de CysC. Parâmetros experimentais: CAb 10 μg/mL; CysC 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 500 ng/mL; DAB 2 μg/mL; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três repetições.

Através da informação apresentada na Figura 4.18, confirmou-se que o imunoensaio desenvolvido responde a concentrações crescentes de CysC, uma vez que a intensidade da corrente do pico aumenta com o aumento da concentração do antigénio. Contudo, como se pode observar na Figura 4.18 b), para concentrações mais elevadas do analito (50-500 ng/mL) verificou-se que o sinal tende a saturar.

Assim, com base nos dados da Figura 4.18, na Figura 4.19, representa-se a curva de calibração para a deteção de soluções padrão de CysC ($i_p (\mu A) = 1,44 \pm 0,05 [CysC] (ng/mL) + 8,6 \pm 0,6$, $r = 0,9981$ ($n = 5$)) e, conseqüentemente, para a quantificação deste analito em amostras reais.

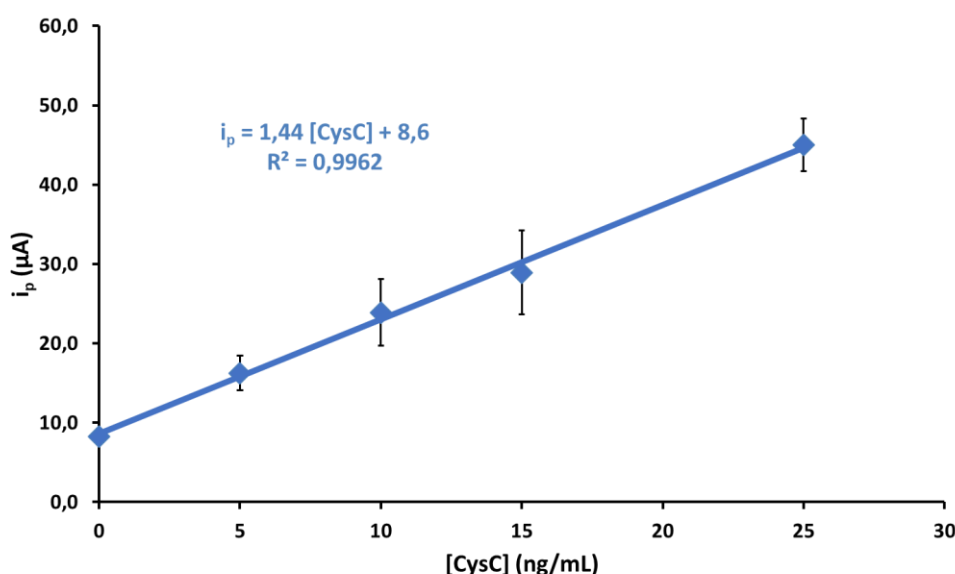


Figura 4.19: Curva de Calibração. Parâmetros experimentais: CAb 10 $\mu\text{g/mL}$; CysC 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 25 ng/mL; DAb 2 $\mu\text{g/mL}$; STR-ALP 1:100 000 com 0,1% de BSA e 3-IP/Ag⁺ 1 mM / 0,4 mM.

No que diz respeito aos limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ), estes foram estimados a partir da curva de calibração (Figura 4.19) de acordo com as equações: $\text{LOD} = 3 \times \frac{S_{y/x}}{m}$ e $\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{y/x}}{m}$, onde $S_{y/x}$ representa o desvio padrão da regressão linear e m corresponde ao declive da reta da curva de calibração. Assim, obteve-se 2,1 ng/mL e 6,8 ng/mL para o LOD e LOQ, respetivamente.

4.5. Precisão

A precisão da resposta do imunoensaio foi avaliada em termos de reprodutibilidade. Para tal, analisou-se a resposta de diferentes ensaios, para 0 ng/mL e 25 ng/mL de CysC, em duplicado, em três dias diferentes. Obtiveram-se coeficientes de variação inferiores a 7% e 10%, respetivamente, o que indica que o imunoensaio desenvolvido fornece resultados precisos.

4.6. Análise de Amostras Reais

Para avaliar o desempenho do imunoensaio do ponto de vista clínico, a concentração de CysC foi determinada em amostras reais, isto é, amostras de soro de pacientes com DRC. Como a concentração típica de CysC no soro é significativamente

superior à concentração mais elevada da gama de linearidade do imunoensaio, foi necessário efetuar a diluição das amostras reais analisadas. Neste sentido, com base na equação da reta da curva de calibração (Figura 4.19) e na intensidade média da intensidade corrente de pico obtida para a amostra, determinou-se a concentração de CysC na mesma (Tabela 4.1). Os resultados obtidos foram comparados com os de um método estabelecido (PENIA). Com base nos desvios relativos, pode-se concluir que o imunoensaio fornece resultados exatos, o que permite a sua utilização para a deteção da CysC em amostras reais de pacientes com DRC no estágio inicial da doença.

Tabela 4.1: Comparação dos resultados obtidos com o PENIA e com o imunoensaio desenvolvido para a determinação da CysC em amostras de soro humano.

Estádio da DRC	Método Analítico	[CysC] (ng/mL)	Desvio Relativo (%)
1	PENIA	819	-8,34
	Imunoensaio	750,68 ± 111,28	
2	PENIA	950	14,98
	Imunoensaio	1092,27 ± 166,29	

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A DRC é uma patologia que nos estádios iniciais é silenciosa e assintomática, pelo que os imunoenaios eletroquímicos, através da análise rápida e específica de biomarcadores, como a CysC, são uma alternativa competitiva para a prevenção e/ou diagnóstico precoce desta doença.

Nesta dissertação foi desenvolvido um imunoenamo magnético de tipo “sanduíche” para a análise da CysC. O sinal analítico foi detetado num SPCE recorrendo a uma marca enzimática e deteção eletroquímica de um dos produtos da reação. O imunoenamo desenvolvido revelou ter uma elevada precisão (coeficiente de variação inferior a 10%) num tempo de análise total inferior a 4 horas. Além disso, as MBs modificadas com CAb foram estáveis durante um período de uma semana. O imunoenamo apresentou uma resposta linear entre 5 ng/mL e 25 ng/mL de CysC e foi aplicado com êxito na determinação deste biomarcador em amostras reais de soro.

O ensaio desenvolvido possui inúmeras vantagens quando comparado com métodos estabelecidos, nomeadamente a simplicidade, sensibilidade e baixo custo. O uso de SPCEs confere o enorme potencial de integrar o ensaio em sistemas de análise portátil, descartável e descentralizada, de modo a melhorar e facilitar a prática clínica atual. Para este imunoenamo também não é necessária instrumentação complexa nem pré-tratamento da amostra, à exceção de uma diluição simples no tampão adequado, o que constitui mais uma vantagem no que diz respeito a um possível desenvolvimento de dispositivos de análise POC.

Os resultados obtidos indicaram que o imunoenamo desenvolvido pode contribuir para o diagnóstico precoce e descentralizado da DRC, contudo deverão efetuar-se estudos subsequentes. Deste modo, como perspetivas futuras sugere-se a análise de um número superior de amostras reais de soro, não só de pacientes com DRC em diferentes estádios, mas também de soros controlo, sendo os respetivos resultados comparados com a informação obtida através de procedimentos já estabelecidos para a análise e deteção da CysC. A redução do tempo de ensaio através da junção de etapas e a análise da estabilidade das MBs modificadas com CAb para tempos de armazenamento mais longos poderão, também, ser fatores a avaliar.

Referências Bibliográficas

- [1] GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas. “História”. <http://www.graq.isep.ipp.pt/index.php?page=historia> (acedido em 26 de dezembro de 2018).
- [2] GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas. “Investigação: Áreas de Investigação e Desenvolvimento”. <http://www.graq.isep.ipp.pt/index.php?page=investigacao> (acedido em 26 de dezembro de 2018).
- [3] GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas. “Localização”. <http://www.graq.isep.ipp.pt/index.php?page=localizacao> (acedido em 06 de abril de 2019).
- [4] Silva, AD, Gramaxo, F, Santos, ME, Mesquita, AF, Baldaia, L, Félix, JM, 2004, *Planeta Vivo, Viver melhor na Terra, Ciências Físicas e Naturais, Ciências Naturais, 3º ciclo*. Porto (Portugal): Porto Editora. 145-147pp.
- [5] 2013, *Corpo Humano - Manual de Identificação: o seu corpo e como funciona*. Lisboa (Portugal): Quimera Editores. 242-243pp.
- [6] CUF e InfoCiência. “Doença renal crónica”. <https://www.saudecuf.pt/mais-saude/doencas-a-z/doenca-renal-cronica> (acedido em 26 de dezembro de 2018).
- [7] Devarajan, P, Jefferies, JL (2016). *Progression of Chronic Kidney Disease after Acute Kidney Injury*, *Progress in Pediatric Cardiology* 41, 33-40.
- [8] Santos-Silva, A, Costa, E, Alves, R, 2015, *Chronic Kidney Disease*. In: Palavra F, Reis F, Marado D, Sena A (eds) *Biomarkers of Cardiometabolic Risk, Inflammation and Disease*. Springer, Cham.
- [9] Hill, NR, Fatoba, ST, Oke, JL, Hirst, JA, O’Callaghan, CA, Lasserson, DS, Hobbs, FDR (2016). *Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis*, PLOS ONE.
- [10] NephroCare. “O estadio da minha doença”. <https://www.nephrocare.pt/doentes/os-rins-e-a-doenca-renal/o-estadio-da-minha-doenca.html> (acedido em 26 de dezembro de 2018).

- [11] Kar, S, Paglialunga, S, Islam, R (2018). *Cystatin C Is a More Reliable Biomarker for Determining eGFR to Support Drug Development Studies*, The Journal of Clinical Pharmacology 58 (10), 1239-1247.
- [12] Rysz, J, Gluba-Brzózka, A, Franczyk, B, Jablonowski, Z, Cialkowska-Rysz, A (2017). *Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome*, International Journal of Molecular Sciences 18, 1702.
- [13] Lopez-Giacoman, S, Madero, M (2015). *Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage*, World Journal of Nephrology 4 (1), 57-73.
- [14] Lopes, P, Costa-Rama, E, Beirão, I; Nouws, HPA, Santos-Silva, A (2019). *Disposable electrochemical immunosensor for analysis of cystatin C, a CKD biomarker*, Talanta 201, 211-216.
- [15] Fassett, RG, Venuthurupalli, SK, Gobe, GC, Coombes, JS, Cooper, MA, Hoy, WE (2011). *Biomarkers in chronic kidney disease: a review*, Kidney International 80, 806-821.
- [16] Beker, BM, Corleto, MG, Fieiras, C, Musso, CG (2018). *Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns*, International Urology and Nephrology 50, 705-713.
- [17] Lin, C, Chang, Y, Chuang, L (2016). *Early detection of diabetic kidney disease: Present limitations and future perspectives*, World Journal of Diabetes 7 (14), 290-301.
- [18] Onopiuk, A, Tokarzewicz, A, Gorodkiewicz, E (2015). *Cystatin C: A Kidney Function Biomarker*, Advances in Clinical Chemistry 68, 57-69.
- [19] Peters, B, Rule, AD, Kashani, KB, Lieske, JC, Mara, KC, Dierkhising, RA, Barreto EF (2018). *Impact of Serum Cystatin C-Based Glomerular Filtration Rate Estimates on Drug Dose Selection in Hospitalized Patients*, Pharmacotherapy 38 (10), 1068-1073.
- [20] Desai, D, Kumar, A, Bose, D, Datta, M (2018). *Ultrasensitive sensor for detection of early stage chronic kidney disease in human*, Biosensors and Bioelectronics 105: 90-94.
- [21] Rodbard, D (2016). *Continuous Glucose Monitoring: A Review of Successes, Challenges, and Opportunities*, Diabetes Technology & Therapeutics 18.

- [22]Thevenot, D, Toth, K, Durst, R, Wilson, G (2001). *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*, Biosensors and Bioelectronics 16, 121-131.
- [23]Marques, RCB (2013). *Imunossensores Eletroquímicos para o Diagnóstico Precoce e Descentralizado do Cancro da Mama*, Tese de Mestrado em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica, Instituto Superior de Engenharia do Porto. 15-16pp.
- [24]Felix, FS, Angnes, L (2017). *Electrochemical immunosensors - A powerful tool for analytical applications*, Biosensors and Bioelectronics 102, 470-478.
- [25]Warsinke, A, Benkert, A, Scheller, FW (2000). *Electrochemical immunoassays*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 366, 622-34.
- [26]Hervás, M, López, MA, Escarpa, A (2009). *Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: an anticipated analytical tool for food safety*, Analytica Chimica Acta 653, 167-72.
- [27]Ricci, F, Volpe, G, Micheli L, Palleschi, G (2007). *A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis*, Analytica Chimica Acta 605, 111-129.
- [28]Fernández-Sánchez, C, Costa-García A (1998). *3-Indoxyl Phosphate: an Alkaline Phosphatase Substrate for Enzyme Immunoassays with Voltammetric Detection*, Electroanalysis 10 (4), 249-255.
- [29]Preechaworapun A, Dai Z, Xiang Y, Chailapakul O, Wang J (2008). *Investigation of the enzyme hydrolysis products of the substrates of alkaline phosphatase in electrochemical immunosensing*, Talanta 76, 424-431.
- [30]Fanjul-Bolado, P, Hernández-Santos, D, González-García MB, Costa-García, A (2007). *Alkaline Phosphatase-Catalyzed Silver Deposition for Electrochemical Detection*, Analytical Chemistry 79 (14), 5272-5277.
- [31]Valverde, A, Povedano, E, Montiel, VR, Yáñez-Sedeño, P, Garranzo-Asensio, M, Rodríguez, N, Domínguez, G, Barderas, R, Campuzano, S, Pingarrón, JM (2018). *Determination of Cadherin-17 in Tumor Tissues of Different Metastatic Grade Using a Single Incubation-Step Amperometric Immunosensor*, Analytical Chemistry 90, 11161-11167.
- [32]Ricci, F, Adornetto, G, Palleschi, G (2012). *A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors*, Electrochimica Acta 84, 74-83.

- [33] ThermoFisher Scientific. “Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid”. May 5, 2010. https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/dynabeads-myone-carboxylic-acid.html?fbclid=IwAR0itubYr9-2PHGOaCtuE9TouQDJBDgbXuF_-pV9GS5-Dun0Pui2ph62N6Q (acedido em 26 de maio de 2019).
- [34] Moreno-Guzmán, M, González-Cortés, A, Yáñez-Sedeño, P, Pingarrón, JM (2011). *A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles*, Analytica Chimica Acta 692, 125-130.
- [35] Zani, A, Laschi, S, Mascini, M, Marrazza, G (2011). *A New Electrochemical Multiplexed Assay for PSA Cancer Marker Detection*, Electroanalysis 23, 91-99.
- [36] Eguílaz, M, Moreno-Guzmán, M, Campuzano, S, González-Cortés, A, Yáñez-Sedeño, P, Pingarrón, JM (2010). *An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes*, Biosensors and Bioelectronics 26 (2), 517-522.
- [37] Romanazzo, D, Ricci, F, Volpe, G, Elliott, CT, Vesco, S, Kroeger, K, Moscone, D, Stroka, J, Egmond, HV, Vehniäinen, M, Palleschi, G (2010). *Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples*, Biosensors and Bioelectronics 25, 2615-2621.
- [38] Wang, H, Wang, J, Timchalk, C, Lin, Y (2008). *Magnetic Electrochemical Immunoassays with Quantum Dot Labels for Detection of Phosphorylated Acetylcholinesterase in Plasma*, Analytical Chemistry 80 (22), 8477-8484.
- [39] Valverde, A, Povedano, E, Montiel, VR, Yáñez-Sedeño, P, Garranzo-Asensio, M, Barderas, R, Campuzano, S, Pingarrón, JM (2018). *Electrochemical immunosensor for IL-13 Receptor $\alpha 2$ determination and discrimination of metastatic colon cancer cells*, Biosensors and Bioelectronics 117, 766-772.
- [40] Martín-Yerga, D, Rama, EC, García, AC (2016). *Electrochemical Study and Determination of Electroactive Species with Screen-Printed Electrodes*, Journal of Chemical Education 93, 1270-1276.
- [41] Li, M, Li, Y, Li, D, Long, Y (2012). *Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review*, Analytica Chimica Acta 734, 31-44.

- [42] Arduini, F, Micheli, L, Moscone, D, Palleschi, G, Piermarini, S, Ricci, F, Volpe, G (2016). *Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis*, Trends in Analytical Chemistry 79, 114-126.
- [43] Tudorache, M, Bala, C (2007). *Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 388, 565-578.
- [44] Sales, MGF, Duarte, AJA, Garrido, EMPJ, Garrido, JMPJ, Nouws, HPA, Domingues, VMF. *Laboratório III*. Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto (versão PDF do documento descarregada em 14 de setembro de 2015).
- [45] Harris, DC, *Análise Química Quantitativa*. Editora LTC do grupo GEN. Tradução da 8ª edição norte-americana. 402-403pp.
- [46] Skoog, DA, West, DM, Holler, FJ, Crouch, SR, *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson. Tradução da 8ª edição norte-americana. 628, 655pp. (versão PDF do documento descarregada em 22 de outubro de 2015).
- [47] Metrohm DropSens. “Screen-printed electrodes”. http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html (acedido em 23 de abril de 2019).
- [48] ThermoFisher Scientific. “Avidin-Biotin Interaction”. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html#1> (acedido em 17 de junho de 2019).