

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, AMBIENTAIS E DE TECNOLOGIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS DE  
INFRAESTRUTURA URBANA

Jocimara Camargo da Silva

**Desenvolvimento de biossensor para monitoramento do tratamento de doença  
intensificada pela poluição de áreas urbanas**

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Kelly Mendes Valente

CAMPINAS

2021

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, AMBIENTAIS E DE TECNOLOGIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS DE  
INFRAESTRUTURA URBANA

**Desenvolvimento de biossensor para monitoramento do tratamento de doença  
intensificada pela poluição de áreas urbanas**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbana da Pontifícia Universidade Católica de Campinas em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Infraestrutura Urbana.

Mestranda: Jocimara Camargo da Silva

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Kelly  
Mendes Valente

PUC – Campinas

2021

Ficha catalográfica elaborada por Vanessa da Silveira CRB 8/8423  
Sistema de Bibliotecas e Informação - SBI - PUC-Campinas

628.53  
S586d

Silva, Jocimara Camargo da

Desenvolvimento de biossensor para monitoramento do tratamento de doença intensificada pela poluição de áreas urbanas / Jocimara Camargo da Silva. - Campinas: PUC-Campinas, 2021.

60 f.: il.

Orientador: Renata Kelly Mendes Valente.

Dissertação (Mestrado em Sistemas de Infraestrutura Urbana) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbana, Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Ar - Poluição. 2. Leucemia linfoblástica. 3. Biossensores. I. Valente, Renata Kelly Mendes. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbana. III. Título.

CDD - 22. ed. 628.53

**JOCIMARA CAMARGO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA  
MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE DOENÇA  
INTENSIFICADA PELA POLUIÇÃO DE ÁREAS  
URBANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Sistemas de Infraestrutura Urbana do Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias da Pontifícia Universidade Católica de Campinas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Infraestrutura Urbana.  
Área de Concentração: Sistemas de Infraestrutura Urbana.  
Orientador (a): Prof. (a). Dr. (a). Renata Kelly Mendes Valente.

Dissertação defendida e aprovada em 29 de junho de 2021 pela Comissão Examinadora constituída dos seguintes professores:



---

Prof. Dra. Renata Kelly Mendes Valente  
Orientadora da Dissertação e Presidente da Comissão Examinadora  
Pontifícia Universidade Católica de Campinas



---

Prof. Dr. Augusto Etchegaray Junior  
Pontifícia Universidade Católica de Campinas



---

Dr. José Andrés Yunes  
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

## AGRADECIMENTOS

Agradeço meus pais pelo incentivo sempre.

Agradeço à minha orientadora por me apresentar ao mundo da pesquisa, por tanto que me ensinou desde a Iniciação Científica, por ter me ensinado a escrever um texto, interpretar um resultado, apresentar trabalhos, pela preocupação, pelas conquistas, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, pela paciência, pelas correções, pela confiança, pela parceria. Agradeço por todos esses anos juntas de muito aprendizado.

Agradeço ao meu marido Walter pelo apoio, muito incentivo e por sempre acreditar em mim.

Agradeço aos meus professores não apenas do Mestrado, mas também da Graduação que fizeram com que eu aprendesse aplicar a Química em outras áreas.

Agradeço ao técnico do Laboratório Ricardo por todo o suporte prestado sempre que precisei antes e durante a pandemia.

Agradeço à minha amiga Lara por ter me ajudado nos dias de experimentos com o software no início, pelas risadas e por ter tornado os meus dias no laboratório melhores.

Agradeço às minhas amigas Thainá e Beatriz por todo apoio sempre.

Agradeço a cada pessoa que contribuiu de uma forma ou de outra para que estivesse aqui hoje.

Agradeço à banca avaliadora pelo aceite e por toda contribuição.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (J.C.Silva).

## RESUMO

A urbanização de forma desordenada pode acarretar consequências que afetam a saúde pública, como o acúmulo de poluentes na atmosfera. Estudos têm demonstrado que o benzeno e a exposição à radiação ionizante podem estar relacionados ao aumento no risco de casos de leucemia. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o principal tipo de câncer infantil e um dos tratamentos se refere a aplicação da enzima asparaginase (Asnase) no paciente, com consequente eliminação da célula leucêmica. Entretanto, o corpo pode produzir anticorpos anti-asparaginase, (anti-Asnase) que inibem a atividade enzimática e, portanto, atenuam o efeito farmacológico do tratamento. Desta maneira, o monitoramento desses anticorpos nos pacientes contribui para a eficiência do tratamento. Por isso, o desenvolvimento de novos métodos que permitam essa análise de forma simples, precisa e seletiva é de grande interesse. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para o monitoramento dos anticorpos produzidos pelo organismo humano durante o tratamento da leucemia infantil. Para isso, a enzima Asnase foi imobilizada sobre a superfície de um eletrodo impresso de carbono usando nanocompósito constituído por nanopartícula magnética de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recoberta com quitosana. A interação do anticorpo com a enzima imobilizada gera um imunocomplexo na superfície do eletrodo bloqueando o fluxo de corrente elétrica, resultando na diminuição do sinal. Após otimização do tempo de interação entre nanocompósito e enzima, tempo de interação entre nanocompósito e a superfície do eletrodo e pH de imobilização da biomolécula, o biossensor apresentou linearidade entre as concentrações 0,1 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do anticorpo, com limite de detecção foi de 150  $\text{ng.L}^{-1}$ . Além disso, o dispositivo se mostrou seletivo e apresentou reprodutibilidade de construção com erro padrão relativo de 3,3%. Na aplicação em amostra o erro foi de 11,6%. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o biossensor apresentou perspectivas satisfatórias para monitoramento do anticorpo anti-Asnase durante o tratamento da leucemia infantil.

**Palavras-chave:** Poluição atmosférica; Poluição urbana; Leucemia linfoblástica aguda; Biossensores; Anti-asparaginase.

## ABSTRACT

The disorganized urbanization can have consequences in public health, such as the accumulation of pollutants in the atmosphere. Studies have shown that benzene and exposure to ionizing radiation may be related to an increased risk of leukemia. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the main type of childhood cancer and one of the treatments involves the use of the enzyme asparaginase, with the consequent elimination of the leukemic cell. However, the body can produce anti-asparaginase antibodies, which mitigate the pharmacological effect of the treatment. In this way, the monitoring of these antibodies in patients contributes to the efficiency of the treatment. Therefore, the development of new methods that allow this analysis in a simple, precise and selective way is of great interest. In this context, the aim of this work was the development of an electrochemical biosensor for monitoring the antibodies by the organism during the treatment of childhood leukemia. For this, the enzyme asparaginase was immobilized on the surface of a printed carbon electrode using a nanocomposite made up of a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticle covered with chitosan. The interaction of the antibody with the immobilized enzyme generates a bi-layer on the surface of the electrode blocking the flow of electrical current, resulting in decreased signal amplitude. After optimizing the interaction time between nanocomposite and enzyme, the interaction time between nanocomposite and electrode surface and the immobilization pH of the biomolecule, the biosensor showed linearity for concentrations of the antibody between the 0.1 and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , with a limit of detection 150  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . In addition, the device was selective and showed reproducibility of construction with a relative standard error of 3.3%. In the sample application, the error was 11.6%. From the results obtained, it was found that the biosensor presented satisfactory prospects for monitoring the anti-Asnase antibody during the treatment of childhood leukemia.

**Keywords:** Atmospheric pollution; Urban pollution; Acute lymphoblastic leukemia; Biosensors; Anti-asparaginase.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1 DOENÇAS RELACIONADAS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA URBANA .....	10
1.2 A LEUCEMIA E AS ÁREAS URBANAS .....	11
1.3 O TRATAMENTO PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA).....	13
1.4 BIOCENSORES .....	15
1.5 VOLTAMETRIA.....	20
1.6 BIOCENSORES PARA LEUCEMIA.....	22
2 OBJETIVO.....	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Preparo das soluções.....	27
3.2 Construção do nanocompósito.....	28
3.3 Imobilização da enzima L-Asnase na superfície do eletrodo.....	28
3.4 Interação da enzima L-Asnase com anticorpo anti-Asnase.....	29
3.5 Otimização das condições experimentais .....	31
3.5.1 Tempo de interação entre nanocompósito e L-Asnase .....	31
3.5.2 Tempo de interação entre nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo .....	32
3.5.3 Estudo de pH para imobilização da L-Asnase.....	32
3.6 Obtenção dos parâmetros analíticos do biossensor.....	32
3.6.1 Curva Analítica .....	32
3.6.2 Análise da reprodutibilidade de construção do biossensor.....	33
3.6.3 Análise de seletividade do biossensor.....	33
3.6.4 Aplicação do biossensor em amostra preparada .....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Testes Iniciais de Construção do Biossensor.....	35

4.2 Resposta do biossensor .....	38
4.3 Tempo de interação entre nanocompósito e a L-Asnase .....	39
4.4 Tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo .....	41
4.5 Estudo de pH para imobilização da L-Asnase.....	43
4.6 Curva Analítica do biossensor.....	45
4.7 Análise da reprodutibilidade de construção do biossensor.....	48
4.8 Análise de seletividade do biossensor .....	50
4.9 Aplicação do biossensor em amostra preparada .....	52
5 CONCLUSÃO.....	54
6 RERENCIAS .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Com a expansão do meio urbano, aliado ao adensamento populacional e falta de planejamento, surgem as problemáticas ambientais que podem causar alterações na qualidade da água, do solo e do ar (TUCCI *et al.*, 2003; SANTOS; SILVA, 2016). Entre estes, a poluição atmosférica recebe destaque por ser de difícil remediação.

A poluição atmosférica é decorrente de gases liberados em concentrações bastante elevadas, evitando que processos naturais possam dissipá-los, causando o comprometimento da qualidade do ar, danos à saúde da população, deterioração de bens materiais e contribuição para o efeito estufa. São apontados como os principais emissores de gases poluidores, o desenvolvimento industrial e urbano, crescimento da frota automotiva, altos níveis de padrão de consumo e o desmatamento. No entanto, os gases emitidos pelos combustíveis fósseis, utilizados como fontes energéticas por meio do processo de combustão, são um dos maiores responsáveis pela poluição atmosférica nas grandes cidades. A maioria dos veículos ainda utiliza este tipo de combustível em seus motores, e estudos têm mostrado que a correlação entre a frota de veículos de uma cidade e a poluição é positiva (RIBEIRO; SHIRMER, 2017; MELO *et al.*, 2018; GARG *et al.*, 2019). A quantidade de poluentes liberados na atmosfera depende do tipo de veículo, combustível usado e ano de fabricação (CANCELLI; DIAS, 2014).

A partir do processo de combustão dos combustíveis fósseis é liberado uma diversidade de compostos gasosos, como os óxidos de nitrogênio, monóxidos e dióxidos de carbono, dióxido de enxofre e uma grande quantidade de hidrocarbonetos (RIBEIRO; SHIRMER, 2017). Dentre os compostos emitidos, os orgânicos voláteis chamam atenção por serem considerados tóxicos devido suas propriedades mutagênicas e cancerígenas, especialmente o benzeno, tolueno e xileno (compostos BTX). Além da toxicidade, os compostos BTX podem entrar no organismo de várias maneiras, tais como a oral, inalação e penetração na pele. Os BTX podem causar, a curto prazo, problemas de pele, desconforto no nariz e garganta, incapacidade de concentração, tremores, dor de cabeça entre outros efeitos (GARG *et al.*, 2019). Já a prazos mais longos, a exposição pode causar diminuição na capacidade antioxidante do organismo, o que contribui para danos oxidativos às proteínas, lipídeos e DNA. Ainda, a exposição pode aumentar a probabilidade para os casos de câncer como a

leucemia, doenças cardiovasculares e respiratórias (KERETETSE *et al.*, 2008; BADJAGBO *et al.*, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2016).

### **1.1 DOENÇAS RELACIONADAS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA URBANA**

Em 2010, foi estimado que mais da metade da população mundial estava alocada em áreas urbanas. A tendência para esta estimativa, ao decorrer dos anos, é de aumento significativo (TORRES *et al.*, 2017). No Brasil, no ano de 2015, de acordo com os dados obtidos pela Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), 84,72% da população já vivia em áreas urbanas (IBGE, 2021).

Desde o século XX, a saúde das pessoas que vivem em meios urbanos atrai atenção e preocupação devido à maior concentração de poluentes nessas regiões. Estudos apontam que a qualidade do ar tem papel importante na saúde pública e, ainda, evidenciam associações entre poluentes atmosféricos e o aumento da morbidade e mortalidade em populações (TORRES *et al.*, 2017).

Os poluentes particulados presentes no ar podem penetrar nas regiões da pele que ficam em contato direto com a atmosfera. Nesse sentido, a pele é apontada como órgão-alvo e via de entrada de compostos com potencial tóxico. Leite e Pereira (2017) realizaram uma revisão sistemática sobre as doenças de pele relacionadas à poluição atmosférica e foi relatado que, dos 34 trabalhos selecionados, a maioria (82,3%) apresentaram a ocorrência de dermatite atópica e o restante, mostraram alopecia, envelhecimento cutâneo e câncer de pele. Através dos trabalhos analisados, constatou-se que o processo que acelera o envelhecimento das células e, conseqüentemente o da pele, é provocado pelo estresse oxidativo induzido pelos poluentes. Ainda, os autores evidenciaram a influência de poluentes oriundos de veículos, em grandes centros urbanos, como fator ambiental que intensifica a dermatite. Em relação à associação entre câncer de pele e poluentes atmosféricos, apenas um trabalho foi encontrado abordando a possível associação destes fatores.

Tuan *et al.* (2016) relataram, em um estudo realizado, a relação entre ocorrências de infarto agudo do miocárdio (IAM) e poluentes atmosféricos. Através de trabalhos analisados, os autores apontaram como principais fatores às internações por IAM, em grandes centros e cidades de médio porte, o material particulado, o ozônio, o dióxido de enxofre, o dióxido de nitrogênio e o monóxido de carbono.

A pneumonia é uma doença que pode ser influenciada por diversas causas. No entanto, Tuan *et al.* (2015) analisaram a associação entre os poluentes emitidos no ar e as internações hospitalares por pneumonia em crianças de até 10 anos em São José do Campos, São Paulo. Foi identificado um aumento na concentração de ozônio no ar, comparando-se os resultados obtidos no ano de 2012 ( $94,4 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e os de outro trabalho entre os anos de 2000-2001 ( $65 \mu\text{g m}^{-3}$ ), tornando o ozônio um importante fator de impacto na hospitalização por pneumonia. Segundo os autores, a elevação da concentração de ozônio pode ser atribuída ao aumento da frota de veículos observada no mesmo período de tempo, uma vez que a queima do combustível fóssil gera óxido de nitrogênio e através de reações na atmosfera pode dar origem ao ozônio. No estudo, constatou-se que o monóxido de carbono foi o único poluente associado a todos os tipos de doenças respiratórias, incluindo a pneumonia.

Em revisão sistemática dos estudos epidemiológicos desenvolvidos no estado São Paulo, elaborada por Dapper *et al.* (2016), foi mostrado que as doenças associadas aos poluentes, presentes na atmosfera, vão além das respiratórias e circulatórias. Os altos níveis de poluentes poderiam estar associados, também, ao baixo peso de recém-nascidos, partos prematuros, anemia falciforme e incidência e mortalidade por alguns tipos de câncer, como a leucemia.

## 1.2 A LEUCEMIA E AS ÁREAS URBANAS

Em uma estimativa mundial realizada pelo Instituto Nacional de Câncer, no ano de 2018, a leucemia ocupou o décimo lugar na classificação dos tumores mais incidentes entre todos os cânceres, sendo para os homens, o risco estimado de 6,5/100 mil. E para as mulheres, estimou-se um risco de 5,0/100 mil. As maiores taxas de incidência de leucemia se encontram nos países de alto desenvolvimento humano como, a Austrália e grande parte da Europa (BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2019). No Brasil, no ano de 2019, foi estimado a ocorrência de 10.800 novos casos da doença, sendo que, em uma estimativa para o triênio de 2020-2022, é previsto para cada ano, 5.920 casos em homens e 4.890 casos em mulheres. (INCA, 2019). Em relação à mortalidade por leucemia no Brasil, no ano de 2017 ocorreram um total de 4.795 óbitos. Para homens, a taxa de bruta mortalidade foi de 4,75/100 mil e para as mulheres, a taxa bruta foi de 4,25/100 mil. Ademais, a leucemia acomete com maior

frequência adultos com idade superior a 55 anos, mas também ocorre em crianças, sendo o câncer mais comum em crianças menores de 15 anos (INCA, 2019).

A leucemia é uma doença maligna, muitas vezes, de origem desconhecida e ocorre devido algumas células jovens sofrerem mutação genética, tornando-as cancerígenas. Essas células passam então a multiplicar-se com maior rapidez do que as células sanguíneas normais, de forma que passam a substituí-las. Assim sendo, a leucemia pode ser agrupada de acordo com a velocidade de evolução da doença, podendo ser crônica (geralmente agrava-se lentamente) ou aguda (agrava-se rapidamente). Podem ser classificadas também, baseando-se nos tipos de glóbulos brancos afetados. As leucemias que afetam as células linfoides são chamadas de linfóide, linfocítica ou linfoblástica. Já as que afetam as células mieloide são chamadas de mieloide ou mieloblástica. Com base nas duas classificações apresentadas, existem quatro tipos de leucemia mais comuns: a leucemia linfóide crônica (LLC), a leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e a leucemia mieloide aguda (LMA) (CAVALCANTI JUNIOR, 2005).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é descrita pelo aparecimento de células do tipo linfóide (glóbulo branco) imaturas, com características malignas na medula óssea. Este tipo de leucemia raramente é diagnosticado em adultos, sendo mais comum sua manifestação em crianças, representando um terço dos tumores infantis (HARRISON, 2011).

A LLA prevalece nas idades entre 2 a 5 anos (CAZÉ *et al.*, 2010). A sobrevida mediana estimada para a doença no período de 2010-2014 foi de 66%. Embora as causas dessa doença ainda não estejam bem definidas, há estudos que indicam a possível associação com os fatores ambientais, tais como a exposição ao benzeno e à radiação ionizante (raios X e gama) (INCA, 2019).

Estudos mostram que os poluentes atmosféricos intensificados em centros urbanos por emissão industrial e/ou de veículos que queimam combustíveis fósseis, podem ser fatores agravantes para os riscos de casos de leucemia. Segundo Schraufnagel *et al.* (2019), a exposição ao benzeno, presente no escapamento de veículos, durante o pré-natal e os primeiros anos de vida, poderiam aumentar o risco da criança desenvolver leucemia.

Na capital do Irã, Teerã, um estudo conduzido pelos autores Seifi *et al.* (2019), analisou a associação entre os poluentes ambientais, material particulado (MP<sub>10</sub>), dióxido de enxofre e dióxido de nitrogênio com o câncer infantil. Os autores concluíram que o risco de câncer infantil pode estar associado ao aumento da proximidade de áreas industriais, rodovias e regiões de cidades com grande tráfego.

Schüz e Erdmann (2016) revisaram, na literatura, trabalhos que relacionaram a exposição ambiental aos riscos de casos de leucemia. Os autores apresentaram possível associação, no entanto, sugerem trabalhos adicionais para melhor conclusão. No mesmo trabalho, os autores apresentaram preocupações levantadas sobre a influência da exposição à radiação não ionizante, como os campos eletromagnéticos de radiofrequência e os de frequência extremamente baixa, no câncer infantil.

Diante do exposto sobre alguns fatores, amplificados em meio urbano, que podem influenciar na incidência de casos de leucemia, Schüz e Erdmann (2016) ressaltaram que é fundamental a identificação das causas para a implementação da prevenção primária, devido aos efeitos adversos da doença, do tratamento e dos possíveis efeitos tardios.

### **1.3 O TRATAMENTO PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)**

Os avanços na sobrevida do paciente estão associados aos constantes aperfeiçoamentos nos protocolos terapêuticos, à adequação no tratamento, ao desenvolvimento de novos medicamentos, assim como ao fornecimento de dados essenciais à farmacoterapia da LLA, tornando possível a avaliação da eficácia do tratamento, bem como a necessidade de alterações no mesmo (CAZÉ *et al.*, 2010).

Na década de 1980, iniciou o primeiro protocolo brasileiro multicêntrico de tratamento da LLA infantil, surgindo o Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI-LLA-80). Tal protocolo sofreu alterações ao longo do tempo, visando aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes, fazendo com que, no Brasil, o mesmo seja utilizado em tratamentos até os dias atuais. Neste protocolo, inicialmente ocorre a distribuição dos pacientes em dois grupos: o de baixo risco e o de alto risco. Cada grupo tem o tratamento dividido em etapas, cada qual possui um período de duração. O período de duração total do tratamento é por volta

de dois anos. Ainda, em cada etapa específica são administrados um conjunto de medicamentos com doses já previstas. Embora esse conjunto de ações provoque efeitos colaterais, os protocolos de tratamento utilizados são de suma importância para a cura da doença (ELMAN, *et al.*, 2007; CAZÉ *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por Saraiva *et al.* (2018) no período de 1980 a 2015, foi observado nas últimas décadas uma redução mundial na mortalidade de crianças e adolescentes com leucemia. Porém, em países com alta renda, a redução se mostrou mais significativa. No Brasil, essa redução foi mais proeminente nos estados com melhores condições socioeconômicas, evidenciando uma possível relação entre a taxa de mortalidade por leucemia e tais condições. Por fim, os autores atribuíram tal redução na mortalidade por leucemia aos avanços e melhorias no tratamento da doença.

Entre os medicamentos presentes nas etapas do tratamento, está a L-asparaginase (L-Asnase), utilizada também em vários protocolos desenvolvidos em outros países. A inclusão desse medicamento no tratamento causou significativo aumento no número de pacientes que entraram em remissão. Entretanto, sua alergenicidade e seu perfil de hipersensibilidade têm sido motivo de preocupação, embora estudos para modificar essas características venham sendo explorados. Como uma das alternativas para substituição da L-Asnase, existe a peg-asparaginase que apresenta melhor perfil em relação à imunogenicidade e ainda, tem menor número de administração. Apesar das vantagens, o alto custo da peg-asparaginase dificulta sua inclusão nos protocolos (CAZÉ *et al.*, 2010).

Uma das características das células cancerígenas leucêmicas é a alteração no seu metabolismo. Como consequência, a célula leucêmica apresenta deficiência na síntese do aminoácido asparagina, sendo este, necessário e essencial para a síntese proteica, ou seja, a asparagina é essencial para sua sobrevivência. Não podendo sintetizar o aminoácido necessário, a célula cancerígena passa a utilizar a asparagina extracelular para manter-se viva. Nesse sentido, a enzima L-Asnase, utilizada no tratamento para LLA, de origem bacteriana, possui a capacidade de converter o aminoácido asparagina em ácido aspártico. Assim, a partir da degradação do aminoácido essencial, ocorre a inibição da síntese proteica da célula cancerígena e então, a morte celular da mesma (MOSCARDÓ GUILLEME *et al.*, 2013).

Entretanto, a L-Asnase está associada a alguns dos efeitos secundários do tratamento, como a redução na síntese de outras proteínas essenciais ao organismo, coagulopatia, pancreatite, difusão hepática, cerebral entre outros. Além disso, a sua origem bacteriana provoca reações imunes do organismo, como a hipersensibilidade e formação de anticorpos. Em relação aos anticorpos, estes são denominados anti-asparaginase (anti-Asnase) e atuam especificamente sobre a enzima para qual foram desenvolvidos pelo organismo. Desta maneira, tal ação imune pode causar a rápida inibição da L-Asnase, levando o paciente a desenvolver resistência ao tratamento. A inibição ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes. Nesse caso, o tratamento é avaliado e considerada a necessidade de alterações (ALVES *et al.*, 2007; MOSCARDÓ GUILLEME *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2016). Além disso, quando ocorre as reações adversas, a não interrupção da administração da L-Asnase pode agravar tais efeitos (BALLÓN COSSÍO, 2014).

Desta forma, a proposta do desenvolvimento de um dispositivo para o acompanhamento do tratamento da leucemia infantil LLA, que seja capaz de detectar a presença destes anticorpos, se torna significativamente considerável por contribuir com a redução de efeitos colaterais.

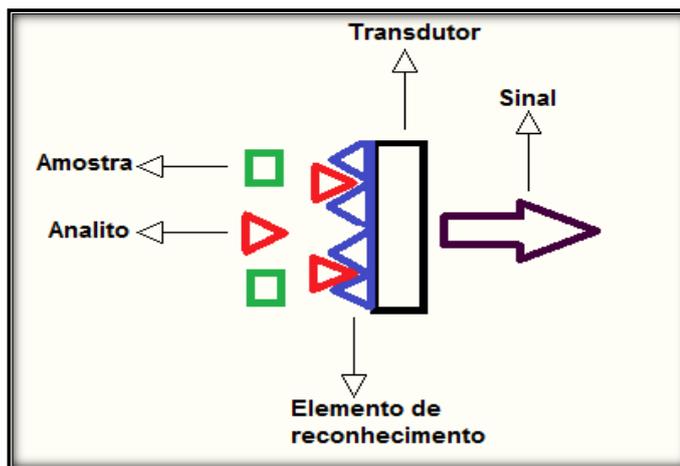
Para isso, os biossensores se mostram uma boa alternativa devido a seletividade que as interações biológicas oferecem para determinação de um analito. Tais dispositivos são encontrados em diversas áreas como, saúde, alimentos, agronomia, entre outras, e ganham cada vez mais espaço em pesquisas e empresas. Estes dispositivos chamam atenção por suas atratividades como, a possibilidade de análise em tempo real, não sendo necessário técnicos especializados para seu manuseio, além de fornecer resposta rápida sem a necessidade de pré-tratamento da amostra (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

#### **1.4 BIOSSENSORES**

O biossensor pode ser definido como um subgrupo dos sensores químicos, que contém como elemento de reconhecimento uma molécula biológica (anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, organelas e células) com a função de traduzir as informações do domínio bioquímico, geralmente a concentração de uma espécie, em um sinal com uma sensibilidade definida. O elemento de reconhecimento é

acoplado a um transdutor que transforma a informação em um sinal mensurável (THÉVENOT *et al.*, 2001; BARROCAS *et al.*, 2008; SALOMÃO, 2018), como mostrado na Figura 1. Dentre os transdutores mais utilizados destacam-se os eletroquímicos, devido ao relativo baixo custo e simplicidade de utilização.

**Figura 1.** Configuração esquemática de um biossensor.



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2013.

Os biossensores por bioafinidade que utilizam como componentes biológicos os anticorpos, antígenos e fragmentos de DNA, possuem uma interação específica e são bastante usados na área da saúde (PORFIRIO *et al.*, 2016). O imunossensor é um tipo de biossensor baseado em reações imunológicas entre um determinado anticorpo e o seu antígeno, podendo ser um ou outro imobilizado na superfície do transdutor como elemento de reconhecimento (DUNAJOVÁ *et al.*, 2019).

Na medicina, o uso de biossensores vem sendo ampliado tanto para o diagnóstico e monitoramento quanto na prevenção de doenças. Nos Estados Unidos, os biossensores são aplicados para acelerar o diagnóstico de exames ou no monitoramento da saúde de pacientes com AIDS e hepatite C. Já no Brasil, os dispositivos têm sido desenvolvidos para diagnosticar doenças ou realizar exames, visto a possibilidade de ser portátil (ANDRADE, 2017).

Os biossensores apresentam uma etapa crítica no momento de sua construção, que se refere a imobilização do biorreconhecedor na superfície sensora. Se a imobilização não for realizada de forma eficiente e estável, pode ocasionar sua

lixiviação, diminuindo a sensibilidade do dispositivo (MARQUES; YAMANAKA, 2008). Há várias formas de realizar a imobilização do elemento de reconhecimento, destacando-se o uso de nanomateriais, tais como as nanopartículas metálicas, como suporte para a biomolécula.

As nanopartículas metálicas aliadas aos transdutores eletroquímicos vêm trazendo excelentes perspectivas para novos sistemas de detecção biológicos. Tais perspectivas se devem à combinação de propriedades atrativas como a biocompatibilidade, condutividade elétrica, estabilidade química e elevada área superficial (SONG; CHOI, 2013). As nanopartículas metálicas apresentam fortes propriedades de adsorção, além de proporcionarem maior sensibilidade ao sensor, pois aumentam a taxa de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, entre outras propriedades vantajosas (YU, *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2018).

Neste sentido, destacam-se as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) por apresentarem propriedades que possibilitam o desenvolvimento de biossensores com alto desempenho. As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  possuem propriedades físico-químicas diferenciadas que estão correlacionadas com sua estrutura cristalina (organização dos átomos de forma geométrica), morfologia e tamanho das partículas. Entre as mais exploradas, está a sua propriedade intrínseca, o magnetismo, que as proporciona a habilidade de se moverem através da influência de um campo magnético, facilitando procedimentos de precipitação e etapas de lavagem, utilizando-se um ímã. Quando o campo é removido elas são dispersas novamente (GEE, *et al.*, 2003; FIGUEROLA *et al.*, 2010; YU, *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2018).

As magnetitas são constituídas pelo ferro em dois estados de oxidação,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ . A sua propriedade magnética se deve à uma propriedade intrínseca dos elétrons, o spin, que pode ser interpretado como a rotação do elétron em torno de um eixo. Por vez, o elétron apresenta carga e, desta forma, o spin é associado a um momento magnético. Em átomos comuns, o spin é nulo, pois elétrons paralelos nos orbitais eletrônicos rotacionam em sentidos diferentes. Por outro lado, certos átomos apresentam spin diferente de zero como, por exemplo, o ferro. Assim, no caso da magnetita, os íons  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  apresentam spins não nulo, dando origem a um fraco momento magnético, o que ocasiona um magnetismo permanente nas partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (NURMI *et al.*, 2005; KUCHERYAVY *et al.*, 2013; FRANCISQUINE *et al.*, 2014).

Os átomos da magnetita estão organizados em uma estrutura chamada espinélio invertido, composta por íons de  $O^{2-}$  coordenados pelos íons  $Fe^{+2}$  e  $Fe^{+3}$ . A presença do ferro nos dois estados de oxidação e a possibilidade de troca de elétrons entre seus centros, fornece à magnetita a possibilidade de conduzir corrente elétrica. Além disso, devido a organização dos átomos na estrutura cristalina, a superfície deste material se apresenta porosa (KUCHERYAVY *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2015). Segundo König *et al.* (2011), as propriedades químicas das superfícies dos óxidos estão associadas às imperfeições em sua estrutura cristalina, como as vacâncias, interstícios e até mesmo as impurezas. Como as vacâncias e interstícios são quimicamente ativos, são geralmente nestes locais onde ocorre o processo de adsorção, possibilitando a imobilização de agentes biológicos. Ainda, nestas regiões ocorrem os processos de transferência de elétrons. Entretanto, as interações físicas entre as nanopartículas metálicas e o biorreconhecedor, neste caso a enzima asparaginase, podem ser consideradas fracas, fragilizando a estabilidade do dispositivo.

A imobilização da enzima no nanomaterial através de ligações covalentes, conhecidamente mais estáveis, é possível por meio da funcionalização do suporte. A funcionalização, por exemplo, pode ser realizada por meio do recobrimento do nanosuporte com polímeros contendo grupos funcionais, tais como o biopolímero quitosana, obtendo-se um nanocompósito. A quitosana é um polímero biocompatível extraído da carapaça de crustáceos e possui grupos amino reativos que permitem a ligação covalente com os grupos reativos presentes na enzima (LIU *et al.*, 2019).

Em relação as vantagens do uso de nanocompósito na produção de biossensores, Godoi *et al.* (2019) desenvolveram um biossensor eletroquímico miniaturizado, utilizando como elemento de reconhecimento a enzima tirosinase para a detecção de clorofenol em águas naturais. O estudo mostrou significativo aumento na corrente elétrica quando a enzima foi imobilizada em nanocompósito constituído por nanopartículas de  $Fe_3O_4$  e quitosana, conferindo ao biossensor maior sensibilidade, com um limite de detecção para o composto clorofenol de  $0,87 \mu\text{mol L}^{-1}$ . De modo similar, Wang *et al.* (2008) desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção de compostos fenólicos, utilizando a enzima tirosinase imobilizada em nanocompósito de  $Fe_3O_4$  e quitosana. Os autores concluíram que o biossensor

desenvolvido apresentou boa repetibilidade e estabilidade, com um limite de detecção para os compostos catecol, cresol e fenol de  $2.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

No setor alimentício, Kundu *et al.* (2019), apresentaram um biossensor para determinação de formaldeído, um adulterante comum no suco de laranja. Para isso, os autores imobilizaram a enzima desidrogenase em nanocompósito constituído por nanotubos de carbono e nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . O dispositivo apresentou alta sensibilidade, atribuída ao aumento na taxa de transferência de elétrons provido pelas nanopartículas metálicas e apresentou um limite de detecção de  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ .

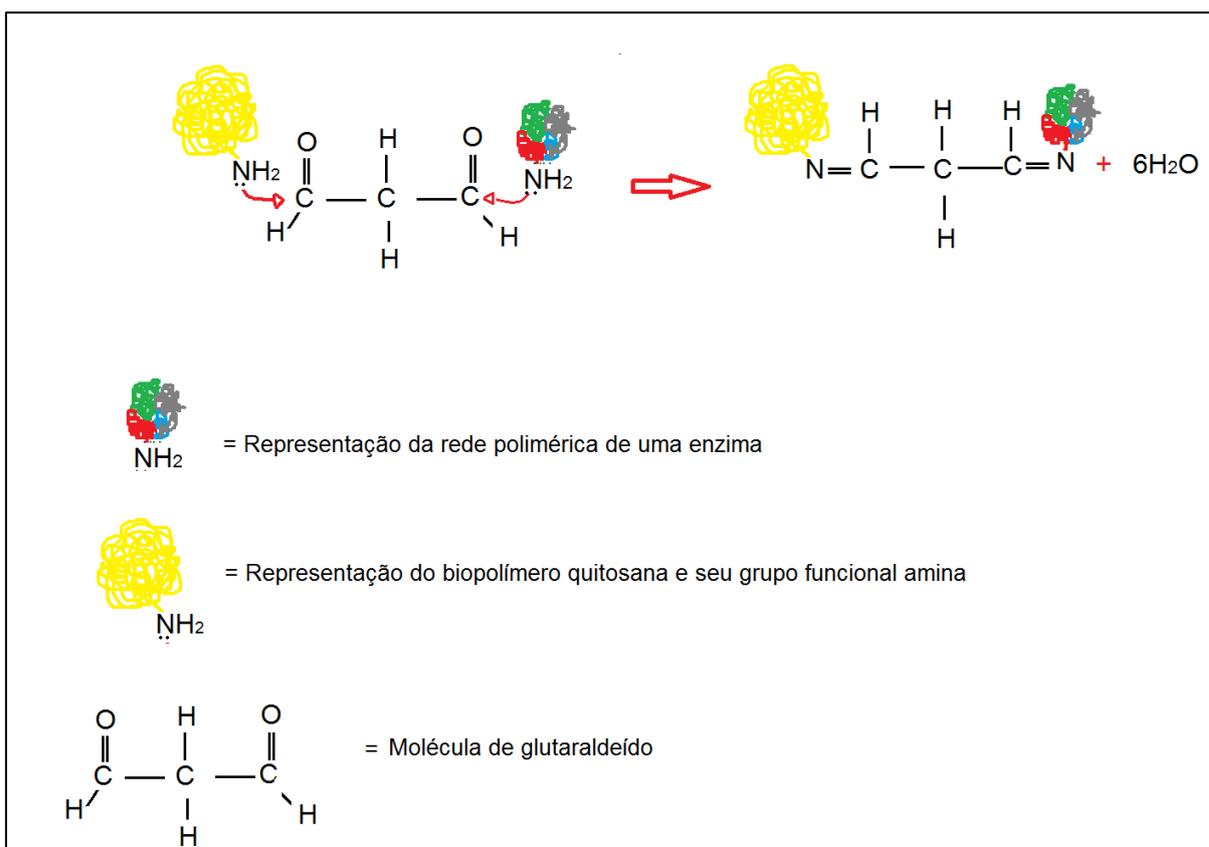
Para Albuquerque *et al.* (2017), a relação custo benefício da tecnologia dos biossensores vem atraindo interesses para o desenvolvimento desses dispositivos para detecção de glicose. Diante disso, os mesmos desenvolveram um biossensor para detecção da glicose, utilizando a enzima glicose oxidase imobilizada em nanocompósito de  $\text{Fe}_2\text{O}_3 / \text{Fe}_3\text{O}_4$  com a superfície funcionalizada com 3-aminopropiltrimetoxissilano e quitosana. Os resultados do trabalho mostraram que a funcionalização da superfície das nanopartículas reduziu o valor de magnetização de saturação, mas manteve a característica ferrimagnética. Além disso, constataram que a funcionalização das nanopartículas aumentou a capacidade de imobilização da enzima, cerca de 2,7 mg de enzima imobilizada para cada 100 mg de nanocompósito.

Além disso, uma melhor imobilização a partir do nanocompósito pode ser realizada através do método de entrecruzamento, que consiste em unir a rede polimérica da quitosana aos grupos funcionais da enzima através de ligações covalentes cruzadas usando agentes de reticulação. O entrecruzamento visa modificações nas propriedades do polímero como, a estabilidade química e térmica, a capacidade de imobilização proteica e celular, além de manter ao máximo as funções e atividades do material biológico, já que esses fatores são importantes para o funcionamento e eficácia desses biossensores (GONSALVES, *et al.*, 2011).

Os agentes de reticulação covalente apresentam baixo peso molecular, grupos reativos e podem ser monofuncionais ou bifuncionais. O primeiro, apresenta o grupo funcional reativo em apenas uma extremidade da molécula como, por exemplo, o formaldeído. Já o segundo, apresenta grupos funcionais reativos nas duas extremidades da molécula como, por exemplo, o glutaraldeído. Durante a reação de entrecruzamento ocorre uma adição nucleofílica da amina, presente em moléculas de cadeias poliméricas, à carbonila dos agentes. A Figura 2 apresenta um esquema da

reação resumida do entrecruzamento que une a rede polimérica da quitosana à uma rede polimérica de uma enzima a partir do glutaraldeído como agente de reticulação (MARQUES; YAMANAKA, 2008; GONSALVES, *et al.*, 2011).

**Figura 2.** Reação resumida do entrecruzamento que une a rede polimérica da quitosana à uma rede polimérica de uma enzima a utilizando o glutaraldeído.



Fonte: Adaptado de Gonsalves, *et al.*, 2011.

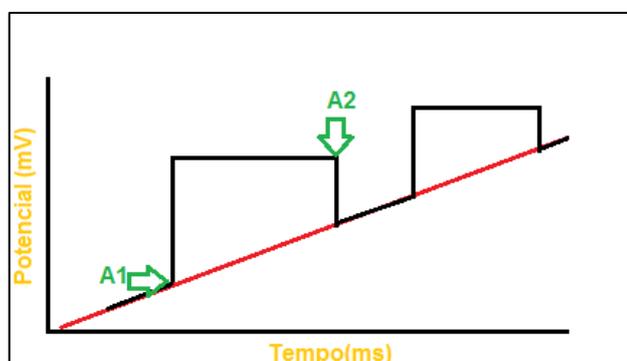
Em relação aos biossensores eletroquímicos, outra vantagem associada é a facilidade de miniaturização do dispositivo, que utilizam volume de amostra e de reagentes em torno de microlitros, diminuindo o custo final da análise e a geração de resíduos (XUAN VIET *et al.*, 2019).

## 1.5 VOLTAMETRIA

A voltametria é uma técnica eletroquímica utilizada para obter informações qualitativas e quantitativas sobre uma espécie química, na qual se obtém uma curva

que relaciona corrente e potencial chamada de voltamograma. Tal técnica exige o uso de três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência, sendo um potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, já o de referência mantém seu potencial constante. Se tratando da voltametria de pulso diferencial, ocorre a aplicação de um pulso de potencial em função do tempo, de forma linear crescente e a corrente é medida em instante antes a aplicação do pulso (A1) e em instante após (A2) (ALEIXO, 2003), como apresentado na Figura 3.

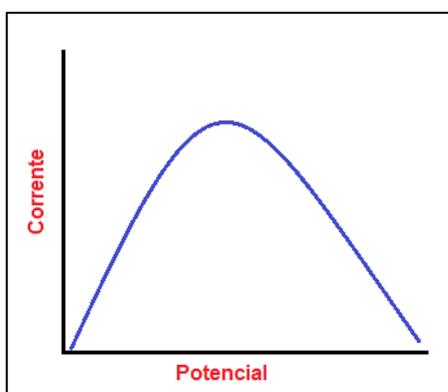
**Figura 3.** Representação da aplicação de um pulso de potencial em função do tempo.



Fonte: Adaptado de Aleixo, 2003.

E a corrente final obtida é a diferença entre A1 e A2, originando um voltamograma: potencial vs corrente, como representado na Figura 4.

**Figura 4.** Representação de um voltamograma da técnica pulso diferencial.



Fonte: Do autor, 2021.

Para substâncias eletroativas, ou seja, que diante da aplicação de determinado potencial passam por processo de oxidação ou redução, gerando fluxo de elétrons, a sua concentração é proporcional a corrente gerada, permitindo sua determinação quantitativa ou a determinação de um segundo composto, podendo ser não eletroativo, de forma indireta (ALEIXO, 2003).

No presente trabalho foi utilizada a técnica de pulso diferencial e monitorada a corrente gerada pelo par redox de Fe (II) / Fe (III) da molécula modelo de  $K_3[Fe(CN)_6]$  para determinação do anticorpo anti-Asnase, que devido ser uma molécula de grande volume causa resistência ao fluxo de corrente entre os eletrodos, diminuindo o sinal.

## 1.6 BIOSSENSORES PARA LEUCEMIA

A leucemia pode levar à morte muitos pacientes diagnosticados com a doença. Na área médica, as pesquisas desenvolvidas relacionadas ao câncer são de suma importância. Pois em tais pesquisas, desenvolve-se, entre outros, dispositivos que auxiliam no diagnóstico de doenças, na prevenção das mesmas, bem como em seu tratamento, possibilitando ao paciente uma qualidade de vida e um tratamento com melhor eficácia (YAZDIAN-ROBATI *et al.*, 2017).

Como descrito anteriormente, a leucemia está relacionada com mutações nas células, podendo ser classificado de acordo com o tipo de célula atingida pela mutação, linfóide ou mieloide, e de acordo com a velocidade de evolução da doença, crônica ou aguda.

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) pode causar mutações na molécula do anticorpo imunoglobina. Existem dois tipos de LLC: o que apresenta mutações na molécula do anticorpo (mLLC) e o que não apresenta mutações na molécula do anticorpo (uLLC). Os pacientes diagnosticados com o tipo uLLC apresentam uma doença mais indolente e com uma média de tempo de vida após o diagnóstico, de 25 anos. Já os pacientes diagnosticados com o tipo mLLC sofrem uma doença mais agressiva e com uma média de sobrevivência de 8 anos.

Diante disso, os autores Ensafi *et al.* (2016) desenvolveram um biossensor capaz de diferenciar estes dois tipos de leucemia, o mLLC e o uLLC. Para a construção do biossensor, a superfície do eletrodo de ouro foi modificada com

nanopartículas de ouro a partir de deposição eletroquímica, seguido por revestimento com a sonda oligonucleotídeo ZAP70. As nanopartículas de ouro fornecem ao biossensor maior sensibilidade devido a maior condutividade e capacidade de imobilizar a sonda. Já a sonda oligonucleotídeos ZAP70, realiza, através de interações químicas, o reconhecimento do gene associado a uLLC e, desta forma, diferencia os dois tipos da doença. O método utilizado foi a espectrometria de impedância eletroquímica e os resultados foram analisados usando as informações de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ), uma vez que a interação entre a sonda e o gene reconhecido fornecem um aumento na resistência à tal transferência. O biossensor construído apresentou um limite de detecção para o gene associado ao uLLC de  $4,0 \cdot 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e, ainda, se mostrou eficaz ao diagnosticar e distinguir os dois tipos de LLC.

Ainda para a detecção da LLC, Ensafi *et al.* (2011) construíram um biossensor baseado no reconhecimento do DNA relacionado ao câncer. A sonda de reconhecimento foi imobilizada em nanopartículas de ouro e as técnicas utilizadas foram a espectrometria de impedância eletroquímica e voltametria cíclica. Para este biossensor, o limite de detecção apresentado foi de  $1,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ .

De modo similar, Mazloum-Ardakani *et al.* (2019), construíram dois biossensores para a detecção da LLA, utilizando diferentes métodos eletroquímicos. O primeiro biossensor (biossensor de DNA) foi construído para a detecção de mutações no DNA relacionadas ao câncer ou ao risco de desenvolvê-lo. O segundo biossensor (biossensor AC), foi construído para a determinação da concentração do antígeno carcinoembrionário, um biomarcador da doença, em amostra de sangue. A alta concentração desse antígeno no sangue indica a presença do câncer, sendo possível estimar o estágio da doença através da sua concentração. Para a construção do biossensor de DNA, utilizou-se como reconhecedor uma sonda imobilizada sobre eletrodo de carbono vítreo, via nanocompósito constituído por nanopartículas de ouro e nanopartículas de carbono. Já para o biossensor AC, utilizou-se o mesmo método de imobilização, porém, usando um aptâmero como reconhecedor. O biossensor de DNA apresentou um limite de detecção de  $1,5 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Em relação ao limite de detecção do biossensor para o antígeno alvo (biossensor AC), o mesmo apresentou um valor de  $0,26 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Os autores afirmam que os biossensores se mostraram seletivos e capazes de detectar a LLA.

Kumar e Walia (2012) desenvolveram um biossensor para o monitoramento da asparagina presente em amostras de sangue com LLA, através da enzima L-asparaginase extraída a partir de pimentões verdes. A enzima foi imobilizada junto ao indicador vermelho fenol no alginato de cálcio e, após, acoplada a um eletrodo sensível a íons. O princípio do biossensor se baseou na mudança de coloração do indicador, indo do vermelho para o violeta, na ocorrência de interação entre a enzima asparaginase e o seu substrato, a asparagina, devido uma reação de desaminação, na qual a asparagina se decompõe em ácido aspártico e em íons  $\text{NH}_4^+$ . Foram estudadas concentrações de asparagina entre  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> e avaliado o tempo de resposta obtido para cada concentração. Para a concentração  $10^{-1}$  mol. L<sup>-1</sup>, o tempo de resposta foi de 12 seg. Já para a concentração  $10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup>, o tempo de resposta foi 7 segs. Observou-se decréscimo no tempo de reação conforme a diminuição na concentração. Na aplicação do biossensor em amostra de sangue normal, o tempo de resposta foi de 9,4 seg com uma concentração de asparagina na faixa de  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Para a amostra de sangue com LLA, o tempo de resposta foi de 11,2 seg. e uma concentração de asparagina na faixa de  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>, evidenciando a maior concentração de asparagina na amostra de sangue com LLA.

De maneira complementar e utilizando o mesmo princípio do estudo anterior, Verma *et al.* (2007), desenvolveram um biossensor para detectar níveis de asparagina em amostras de sangue de pacientes com LLA, utilizando a enzima L-asparaginase, obtida comercialmente, como elemento de reconhecimento. Neste, foram avaliadas diferentes técnicas de imobilização da enzima: com membrana de nitrocelulose, com silicone em gel e com alginato de cálcio. Para cada técnica foi avaliada a capacidade de detecção de asparagina em concentrações entre  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup>. Para a membrana de nitrocelulose, a detecção ocorreu apenas com  $10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> de asparagina. Já quando utilizado o silicone em gel e o alginato de cálcio para imobilização da enzima, o biossensor apresentou resposta para as todas as concentrações de asparagina avaliadas ( $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup>). Segundo os autores, o trabalho desenvolvido mostrou ser possível o desenvolvimento de um biossensor de resposta rápida e com baixo custo.

Para monitoramento do tratamento da LLA, Aubé *et al.* (2016) afirmaram publicar um dos primeiros trabalhos sobre o desenvolvimento um biossensor de ressonância plasmônica de superfície (SPR) para detectar os anticorpos anti-Asnase

desenvolvidos como resposta imune para a enzima L-Asnase administrada durante o tratamento da doença. A técnica citada se baseia em interações entre a luz e uma superfície contendo um metal nobre, neste caso, o ouro. Tais interações são influenciadas por alterações na superfície do metal, de modo que quando o anticorpo se liga ao seu antígeno, imobilizado em tal superfície, ocorre alteração no índice de refração do meio. Para reparar as interações não específicas associadas à técnica, a enzima foi imobilizada na superfície metálica através de uma monocamada auto-organizada de um peptídeo tiolado. Neste estudo, os autores constataram que alterações na conformação da estrutura quaternária da enzima e o método de imobilização influenciaram na atuação do anticorpo sobre a mesma e, conseqüentemente, na sensibilidade do biossensor. Segundo os autores, o dispositivo se mostrou eficaz quando aplicado à uma amostra de sangue real, apresentando um limite de detecção de  $0,5 \text{ nmol.L}^{-1}$ . Por fim, ressaltaram as vantagens do biossensor para detecção desses anticorpos em relação ao método utilizado convencionalmente, o método ELISA, como a maior seletividade e rapidez.

Contudo, de acordo com Carvalho *et al.* (2003), a técnica ressonância plasmônica de superfície apresenta um limite de detecção limitado à grandeza de  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  quando se trata de proteínas de 20 KDa. Ainda, segundo Jamali *et al.* (2014), embora os métodos ópticos apresentem sensibilidade e seletividade, as técnicas eletroquímicas apresentam menores limites de detecção, sensibilidade, seletividade e a possibilidade de miniaturização por menores custos, o que às fornece um grande potencial para fins de diagnóstico clínico.

Como foi descrito, há várias publicações na literatura sobre o desenvolvimento de biossensores para a determinação de compostos no organismo relacionados à leucemia. No entanto, nas bases de dados analisadas, foi pouca a quantidade de trabalhos envolvendo o desenvolvimento de biossensores para uso durante o tratamento da doença. Corroborando, Yao *et al.* (2019) observaram que foram reportados poucos biossensores que utilizaram a enzima L-Asnase como elemento de reconhecimento para analitos. Embora tenha sido encontrado o trabalho de Aubé *et al.* (2016), que utilizou a ressonância plasmônica de superfície para o monitoramento do tratamento, biossensores para a mesma finalidade utilizando técnicas eletroquímicas não foram encontrados. Desta forma, este trabalho apresenta

aspecto inovador e relevância, uma vez que o dispositivo poderia ser utilizado na avaliação do tratamento com LLA.

Como mencionado anteriormente, durante o tratamento com a enzima L-Asnase podem ser produzidos anticorpos anti-Asnase, que são prejudiciais ao combate das células tumorais. Tal constatação sugere o monitoramento da produção do anticorpo durante o tratamento da doença. Para isso, foi monitorada a corrente gerada pelo par redox de Fe (II) / Fe (III), antes e após a presença do anticorpo no sistema. Por meio da imobilização da enzima L-Asnase no dispositivo, haverá formação de um imunocomposto na presença do anticorpo, aumentando a espessura da biocamada na superfície eletródica, com consequente diminuição da taxa de transferência de elétrons devido ao bloqueio da superfície do sensor (BRAIEK *et al.*, 2012).

## 2 OBJETIVO

O objetivo geral foi desenvolver um biossensor eletroquímico para uso no monitoramento do tratamento de doença não infecciosa intensificada pela poluição urbana nas regiões metropolitanas.

Para a realização do objetivo proposto, realizou-se:

- Construção de nanocompósito constituído por nanopartícula de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  envolvida pelo biopolímero quitosana;
- Imobilização da enzima L-Asnase sobre o nanocompósito através de ligação covalente cruzada via glutaraldeído;
- Estudo da resposta do biossensor após interação com o anticorpo anti-Asnase;
- Otimização das condições experimentais;
- Obtenção dos parâmetros analíticos do biossensor;
- Aplicação do biossensor em amostra de tampão de pH fisiológico fortificado com o anticorpo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparo das soluções

- Solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em pHs de interesse:

Foi preparada pesando-se 3,446g de fosfato de sódio monobásico e 3,522g de fosfato dibásico em recipientes diferentes. Após, cada reagente foi dissolvido separadamente em água deionizada.

As duas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 1000 mL e avolumado com água deionizada. Em seguida, foi realizado o ajuste do pH da solução tampão para o pH desejado para cada estudo com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> e ácido clorídrico 1 mol.L<sup>-1</sup>. Finalizado o ajuste, a solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

- Solução de ferricianeto de potássio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>:

Para o preparo dessa solução, inicialmente foi pesado em balança de precisão, 0,164g de ferricianeto de potássio. A massa pesada foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e dissolvida em solução tampão 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7. Após, a solução preparada foi armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

- Solução da enzima L-Asnase 5 U.mL<sup>-1</sup>:

Para a preparação da solução, 1,0 mg da enzima L-Asnase na concentração 10.000 U por 46 mg, foi diluída em 10 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, em pH determinado por estudo, resultando em uma solução da enzima na concentração de 21,7 U.mL<sup>-1</sup>. Após, foi realizada a diluição necessária para obtenção de uma solução da enzima na concentração de 5 U.mL<sup>-1</sup>. Para isso, um volume de 2,3 mL da solução 21,7 U.mL<sup>-1</sup> foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com solução tampão fosfato, 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, em pH determinado por estudo.

- Solução do anticorpo anti-Asnase 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>:

A partir de uma solução inicial de anticorpo anti-Asnase na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> foram realizadas diluições para obtenção de uma solução na concentração de 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>. Para isso, em um Eppendorf® foi dispensado 10 µL da solução inicial e diluída com 990 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.

- Solução glutaraldeído 2,5%:

Para isso, foram pipetados 15,6 mL de uma solução de glutaraldeído 8,0% e diluído em balão volumétrico de 50 mL com solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7, resultando em uma solução de glutaraldeído na concentração de 2,5%.

### 3.2 Construção do nanocompósito

A construção do nanocompósito foi realizada conforme descrito por Ates *et al.* (2018). Para isso, 0,3 g de quitosana foi completamente dissolvida em solução de ácido acético 2% (v/v). Então, 0,15 g de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> secas, sintetizadas de acordo com Ballesteros *et al.* (2014), foram adicionadas à solução de quitosana. A solução obtida foi homogeneizada por 20 minutos no ultrassom. Após, foi adicionado junto às nanopartículas e quitosana, 50 mL de solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. A solução obtida foi centrifugada para precipitação das partículas, retirado o sobrenadante e então o nanocompósito foi lavado com água deionizada até obtenção de pH neutro. O sistema foi seco em estufa na temperatura de 50°C por 12 horas.

Após, 1,0 g do sólido obtido na construção do nanocompósito foi misturado a 30 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) e colocado em agitação por 2 horas para a ativação do nanocompósito. O nanocompósito modificado foi lavado por três vezes com água deionizada para remoção do glutaraldeído que não reagiu e armazenado em solução de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7, na geladeira para posterior imobilização enzimática.

### 3.3 Imobilização da enzima L-Asnase na superfície do eletrodo

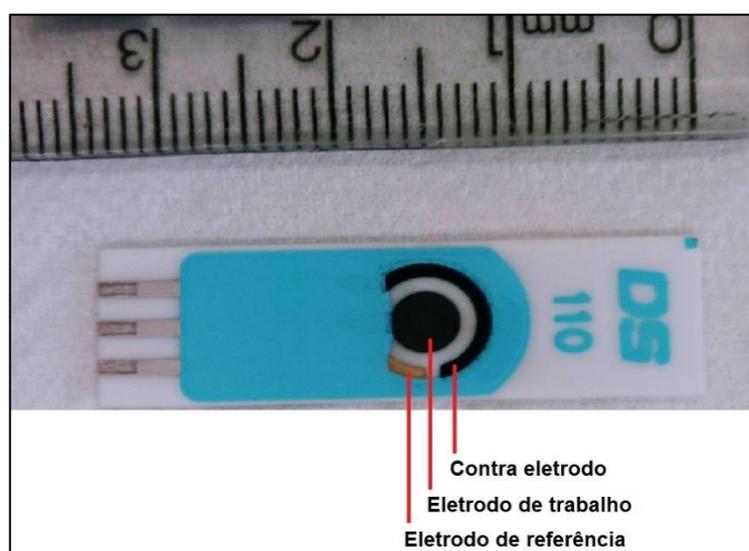
Para maior estabilidade da enzima com relação às variações de pH e temperatura, a L-Asnase foi imobilizada através de ligações covalentes cruzadas sobre o nanocompósito. Para isso, um volume de 5 µL da solução da enzima 5 U.mL<sup>-1</sup> em solução tampão, no pH 7,0, foram adicionados a 1,5 µL do nanocompósito ativado e deixado em geladeira para a imobilização da biomolécula por 96 horas (tempo otimizado).

Após, foi então gotejado sobre o eletrodo de trabalho, 3 µL da solução do nanocompósito modificado com a enzima e deixado em repouso por 30 min para secagem da gota sobre a superfície do eletrodo.

### 3.4 Interação da enzima L-Asnase com anticorpo anti-Asnase

A construção do biossensor foi realizada em eletrodo miniaturizado de carbono impresso constituído por um eletrodo de referência de platina, um contra eletrodo de carbono e um eletrodo de trabalho, também de carbono, como mostrado na Figura 5.

**Figura 5.** Eletrodo de carbono impresso miniaturizado utilizado na construção do biossensor.



Fonte: Do autor, 2020.

Para as medidas eletroquímicas com o biossensor, uma vez que a enzima e o anticorpo não são eletroativos, foi monitorada a diminuição da corrente elétrica na presença da solução eletroativa modelo, no caso, o ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ).

Como descrito anteriormente, a enzima na concentração  $5 \text{ U.mL}^{-1}$  em solução tampão, pH 7,0 foi imobilizada sobre o nanocompósito ativado por um período de 96 horas na geladeira. Após,  $3 \mu\text{L}$  dessa solução foi gotejado na superfície do eletrodo de trabalho e deixado em repouso por 30 min.

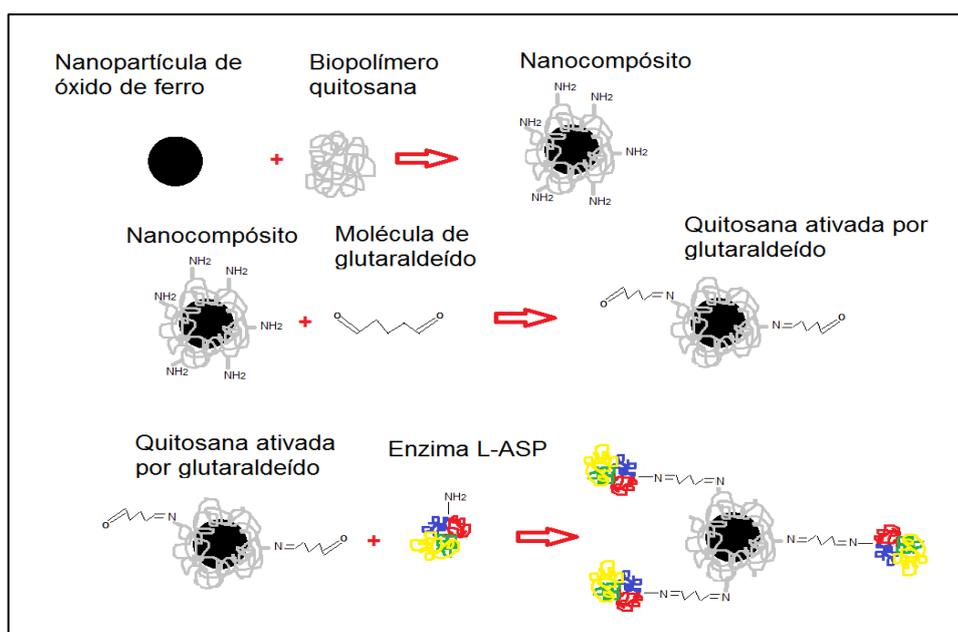
Após a imobilização da enzima sobre o eletrodo de trabalho, o dispositivo foi conectado ao potenciostato. Então, adicionado sobre os três eletrodos,  $35 \mu\text{L}$  da solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0, e realizada a leitura de corrente elétrica.

Posteriormente, a solução foi retirada por um processo de lavagem cuidadoso utilizando pipeta Pasteur com solução tampão fosfato, pH 7,0. Em seguida, foi gotejado sobre a enzima imobilizada 2  $\mu\text{L}$  da solução contendo os anticorpos anti-Asnase na concentração 0,005  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e deixado em repouso por 20 min. para ocorrer a interação antígeno-anticorpo e formação do imunocomplexo. Então, após lavagem cuidadosa com solução tampão fosfato pH 7,0, foi adicionado novamente sobre os eletrodos, a solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , realizada a leitura de corrente elétrica e registrada.

A formação de tal imunocomplexo na superfície do eletrodo de trabalho promove o aumento de espessura da biocamada sobre a superfície eletródica, ocasionando uma diminuição da taxa de transferência de elétrons em relação à medida de corrente sem a presença do anticorpo. A realização das leituras foi feita através de um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 204 (Metrohm), por meio do uso de medidas de voltametria de pulso diferencial.

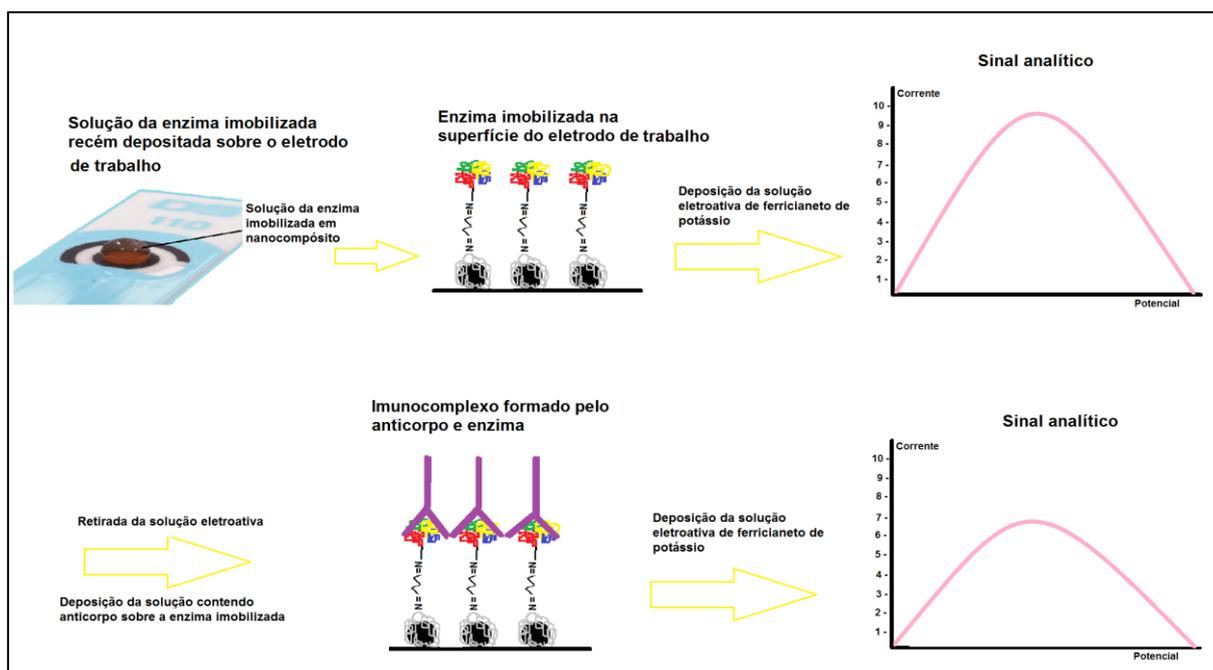
As Figuras 6 e 7 apresentam um resumo das etapas de construção do dispositivo e obtenção dos dados.

**Figura 6.** Demonstrativo das etapas de construção do nanocompósito e imobilização da enzima.



Fonte: Do autor, 2020.

**Figura 7.** Etapas da construção do biossensor e resposta analítica esperada.



Fonte: Do autor, 2020.

### 3.5 Otimização das condições experimentais

Antes de se realizar as medidas do anti-Asnase em amostra de tampão em pH fisiológico fortificado, realizou-se a otimização do sistema para seleção das melhores condições experimentais. Os parâmetros testados foram: o tempo de interação entre nanocompósito e L-Asnase para a imobilização da mesma, o tempo de interação entre o nanocompósito e superfície do eletrodo e o pH para imobilização da L-Asnase.

#### 3.5.1 Tempo de interação entre nanocompósito e L-Asnase

Este estudo é de elevada importância, pois impacta significativamente na estabilidade do dispositivo e, conseqüentemente, em sua sensibilidade. Os tempos estudados foram: 24, 48, 72, 96 e 192 horas. Ressalta-se que para cada tempo estudado, foi construído um biossensor, sendo todos construídos nas mesmas condições experimentais.

### **3.5.2 Tempo de interação entre nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo**

Após a otimização do tempo de imobilização da enzima, foi otimizado o tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e a superfície do eletrodo de trabalho. Os tempos estudados foram, 30, 45, 60 e 120 minutos. Ressalta-se que, para cada tempo estudado foi construído um biossensor, entretanto, todos nas mesmas condições experimentais.

### **3.5.3 Estudo de pH para imobilização da L-Asnase**

A influência do pH foi avaliada considerando-se a imobilização da enzima sobre o nanocompósito. Os pHs avaliados foram: 5,0, 7,0, e 8,5.

Para este estudo foram feitas soluções da enzima L-Ap, como descrito anteriormente, em cada pH de estudo na concentração de 5 U.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Foi retirado, separadamente, 5 µL dessa solução enzimática, em seu respectivo pH de estudo, e colocado em um frasco do tipo Eppendorf®. Em seguida, em cada frasco, foram adicionados 1,5 µL do nanocompósito e deixados em repouso na geladeira por 96 horas para o processo de imobilização. Ressalta-se que, para cada pH estudado foi construído um biossensor, entretanto, todos nas mesmas condições experimentais.

## **3.6 Obtenção dos parâmetros analíticos do biossensor**

Após a otimização das condições experimentais, foi possível obter os parâmetros analíticos do biossensor, tais como região linear, limite de detecção, reprodutibilidade de construção e seletividade e exatidão.

### **3.6.1 Curva Analítica**

Para que o biossensor possa ser usado para monitoramento do anticorpo anti-Asnase em tampão fisiológico, é necessária a obtenção de uma curva de calibração. Para isso, construiu-se os dispositivos, aplicando-se as condições otimizadas selecionadas anteriormente. Foram obtidas as correntes elétricas em

diferentes concentrações de anti-Asnase:  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Foram construídos sete biossensores nas mesmas condições experimentais, um para cada concentração de anticorpo, realizado a leitura antes e após a adição do anticorpo e, então, calculado a variação de corrente elétrica para cada concentração e plotado um gráfico com as variações. A partir da Curva Analítica obtida foi possível calcular o limite de detecção e quantificação

### **3.6.2 Análise da reprodutibilidade de construção do biossensor**

A reprodutibilidade indica se o método usado na confecção dos dispositivos produz respostas confiáveis.

Para isso, foram construídos quatro biossensores nas mesmas condições experimentais. Todos foram avaliados com  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase. Foram realizadas medidas de corrente antes e após a adição do anticorpo para cada biossensor e, então, calculado suas respectivas variações. A partir de tais resultados foi obtido o coeficiente de variação das medidas, avaliando-se a reprodutibilidade do método.

### **3.6.3 Análise de seletividade do biossensor**

Considerando-se que o sangue humano, amostra real para a qual o biossensor foi construído, é constituído por diversos componentes, é necessário realizar o estudo de seletividade do biossensor para possíveis substâncias presentes no sangue e com possibilidade de interferência no sinal obtido. Foi avaliada a seletividade do biossensor para anti-Asnase na presença das seguintes substâncias: glicose (GLI), hemoglobina (HEM) e albumina (ALB), de forma individual e na mistura de todas elas. Tanto as concentrações das substâncias testadas quanto do anti-Asnase foram de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para isso, foram construídos cinco dispositivos nas condições experimentais otimizadas: no biossensor 1 foi adicionado apenas solução de anti-Asnase; no biossensor 2 foi adicionado solução de anti-Asnase + glicose; no biossensor 3 foi adicionado solução de anti-Asnase + hemoglobina; no biossensor 4

foi adicionado solução de anti-Asnase + albumina, no biossensor 5 foi adicionado solução de anti-Asnase + glicose + hemoglobina + albumina. Foi realizada a leitura do sinal de corrente antes e após a adição das biomoléculas sobre o dispositivo. A resposta obtida com o biossensor sem a presença dos possíveis interferentes foi assumida como 100%. A interferência das biomoléculas testadas foi avaliada comparando-se o sinal obtido com o do biossensor 1.

#### **3.6.4 Aplicação do biossensor em amostra preparada**

Para aplicar o biossensor em uma amostra, o mesmo foi testado em uma amostra de tampão fosfato em pH fisiológico (7,4) fortificada com  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase.

Foram construídos três biossensores (triplicata) nas condições otimizadas e gotejados  $3 \mu\text{L}$  da amostra de tampão fortificada. Foram realizadas leituras antes e após a adição da amostra. A equação da reta obtida na Curva Analítica foi usada para converter a média das correntes obtidas em concentração de anticorpo. Assim, a exatidão do biossensor foi obtida.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

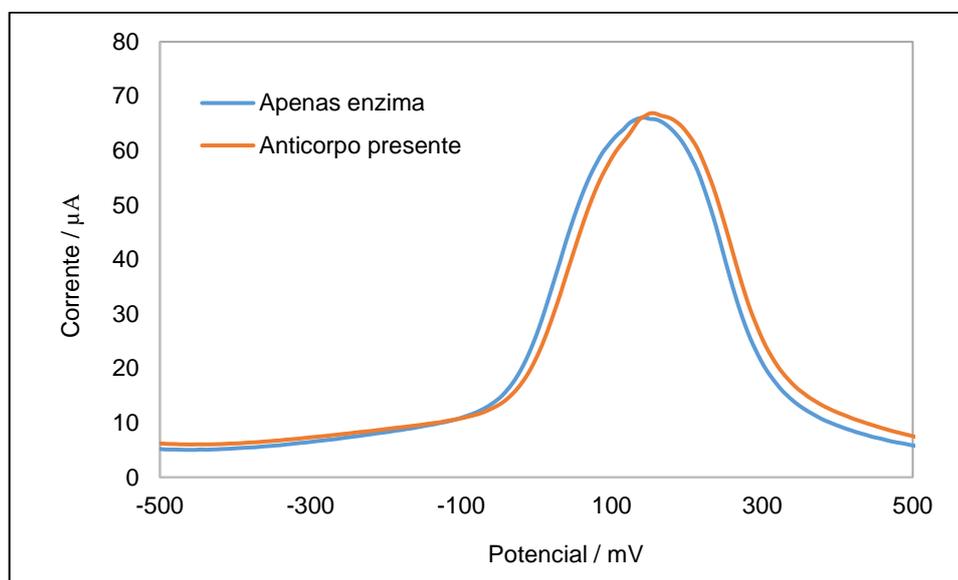
### 4.1 Testes Iniciais de Construção do Biossensor

Conforme descrito anteriormente, trata-se de um biossensor ainda não relatado na literatura. Dessa forma, o procedimento para sua construção foi testado usando algumas metodologias encontradas na literatura para dispositivos de monitoramento da interação antígeno-anticorpo, a fim de selecionar aquela mais adequada a determinação proposta neste trabalho.

Considerando-se que a imobilização do elemento de reconhecimento, a enzima L-Asnase, é de grande importância para a detecção do anticorpo anti-Asnase, os testes iniciais foram realizados para determinação do tipo de suporte para a imobilização da enzima, uma vez que a eficiência da imobilização enzimática ideal é dependente das condições do sistema (MENDES, *et al.*, 2011).

Inicialmente, procurou-se imobilizar a enzima por meio de ligações covalentes, que são conhecidamente mais estáveis. Para isso, utilizou-se o biopolímero quitosana, que possui grupos terminais amino ( $-NH_2$ ), permitindo ligações com o grupo ácido ( $-COOH$ ) terminal da enzima. Assim, uma solução contendo este biopolímero ( $4,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada à solução da enzima L-Asnase por 20 min, sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ . Este processo de imobilização visava uma imobilização rápida, simples e de baixo custo (MONTEIRO; SILVA, 2009). Após o processo de imobilização, o sistema foi lavado com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, para retirar as moléculas fracamente ligadas. Então, este sistema foi gotejado sobre um eletrodo impresso de carbono e aguardou-se o tempo até secagem da gota. Foi medida a corrente elétrica em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$  antes e após a adição do anticorpo anti-L-Asnase. A Figura 8 apresenta os voltamogramas obtidos.

**Figura 8.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para avaliação da quitosana como suporte de imobilização para a enzima L-Asnase em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.

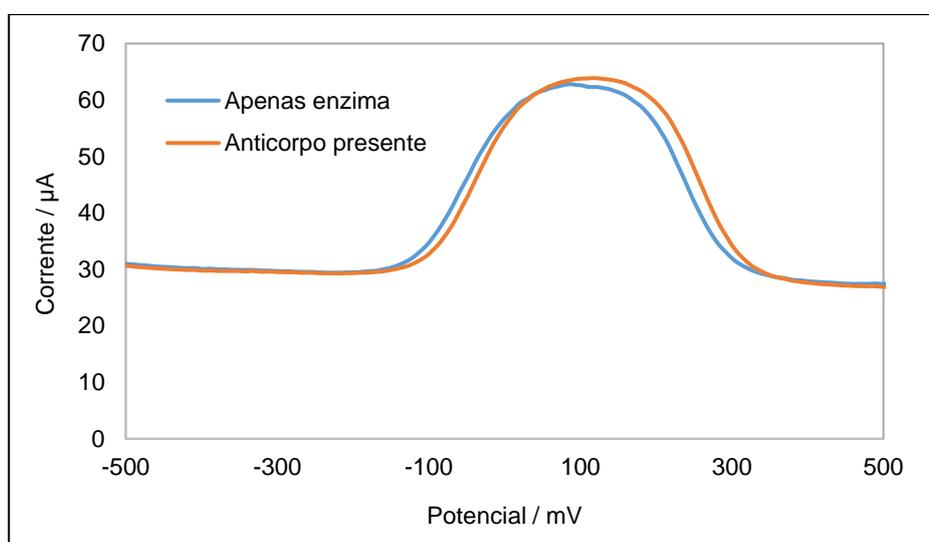


Observando-se a Figura 8 percebe-se que após a adição do anticorpo ocorreu um aumento na corrente elétrica registrada. Sugere-se que, a interação entre anticorpo e antígeno (WILSON; STANFIELD, 2021), pela sua intensidade contribuiu de maneira indesejável no sistema, de forma que ocorreu a retirada da enzima da superfície eletródica, causando assim, o aumento da corrente elétrica após a adição do anticorpo. Isso ocorreu, provavelmente, devido a fraca fixação da enzima sobre a superfície do eletrodo. Ressalta-se que ocorreram diversas tentativas utilizando-se este procedimento, entre elas, alterando-se o pH do meio, uma vez que a quitosana apresenta alterações em suas características físicas e químicas conforme o pH do meio (NURUNNABI, *et al.*, 2017). Procurava-se, dessa forma, tentar uma interação eletrostática entre o grupo amino protonado da quitosana e o grupo desprotonado da enzima. Entretanto, não se obteve resultados satisfatórios.

Ainda se baseando em trabalhos revisados na literatura seguiu-se com os testes para a imobilização da enzima L-Asnase, utilizando-se, agora, nanopartículas de ouro, pois trabalhos evidenciam eficácia na imobilização de biomoléculas utilizando tal método (VIDOTTI, *et al.*, 2011; FURLANI, *et al.*, 2020). Para isso, pipetou-se 50  $\mu L$  da solução das nanopartículas e adicionou-se 3-ácido mercaptopropiônico (3-MPA) a

fim de formar monocamadas auto-organizadas sobre o nanomaterial. É conhecido que a formação destas monocamadas permite imobilização mais estável da biomolécula por meio de ligações covalentes, além de possibilitar que a enzima se mantenha orientada, de maneira a permanecer com seu sítio ativo mais disponível para interação com o anticorpo (MENDES, *et al.*, 2008). Após 20 min, as nanopartículas de ouro modificadas foram adicionadas à solução da enzima L-Asnase para imobilização por 20 min. Após lavagem do sistema com solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, o mesmo foi gotejado sobre a superfície de um eletrodo impresso de carbono. Foi realizada medida antes e após a adição do anticorpo, em solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. A Figura 9 apresenta os voltamogramas obtidos.

**Figura 9.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para avaliação de nanopartículas envolvidas por 3-MPA como suporte de imobilização para a enzima L-Asnase em solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e 50 mV.s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura.



Na Figura 9 percebe-se um aumento na corrente elétrica quando adicionado o anticorpo anti-Asnase. Tal resultado obtido pode ser atribuído à síntese das nanopartículas de ouro ou até mesmo ao tempo desde a síntese da mesma, uma vez que a coloração vermelha-arroxeadada indica transição no tamanho da partícula, assim como alterações em suas características (PATIL; BIM, 2016). Ressalta-se que as nanopartículas usadas neste procedimento já haviam sido sintetizadas no

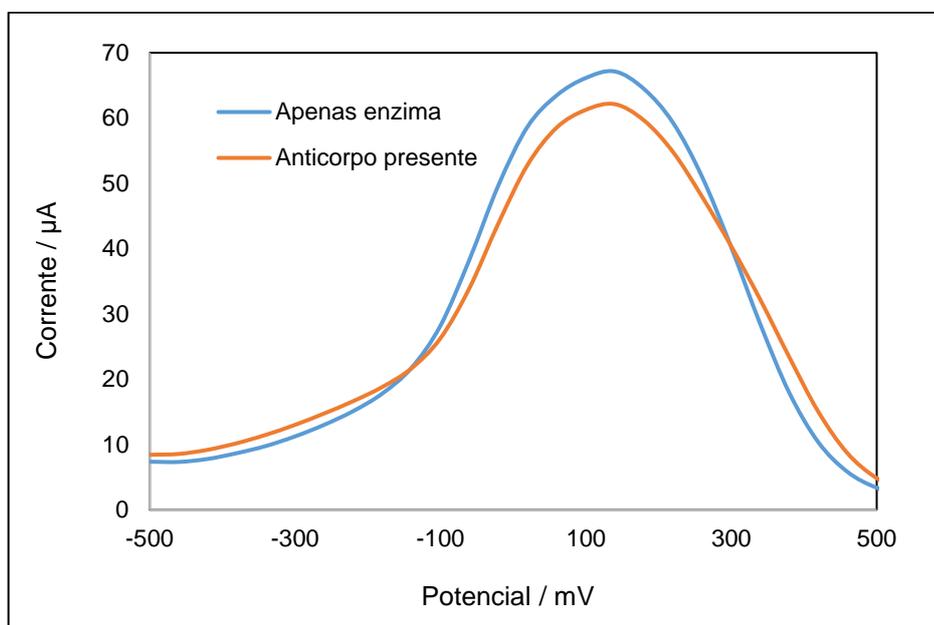
laboratório havia algum tempo e, este fator, pode ter influenciado no processo de construção da monocamada auto-organizada.

Após diversas tentativas de ensaios com diferentes tipos de imobilização e pesquisas na literatura, se chegou ao método de imobilização que utiliza nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas com quitosana. A formação de nanocompósitos formados por nanopartículas de óxidos metálicos com quitosana já é um procedimento conhecido do Grupo de Pesquisa (MENDES *et al.*, 2016). Optou-se pela nanopartícula de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  devido a sua propriedade magnética, que permite ser atraída com a aproximação de um ímã. Dessa forma, as etapas de lavagem do sistema se tornam de maior simplicidade. Além disso, para possibilitar ligações cruzadas mais estáveis com este nanocompósito, utilizou-se também um agente de reticulação, o glutaraldeído. A quitosana reticulada com glutaraldeído é apresentada na literatura como ótimo adsorvente de corantes, fármacos e metais, pois a adição de glutaraldeído permite seu uso em pHs abaixo de 4,0 sem que solubilize (DIAS, *et al.*, 2008). A se tratar de imobilização enzimática, Ates *et al.* (2018) realizaram o recobrimento de nanopartículas magnéticas pelo biopolímero quitosana, obtendo-se nanopartículas magnéticas na estrutura core-shell ativadas por glutaraldeído, possibilitando a imobilização covalente da enzima L-Asnase. Os resultados iniciais obtidos a partir deste procedimento se mostraram eficazes, tornando-o aquele utilizado para imobilização da enzima L-Asnase na construção do biossensor proposto, utilizando-se o nanocompósito modificado com a biomolécula gotejado sobre eletrodos miniaturizados de carbono. No mais, os resultados obtidos são apresentados nos tópicos seguintes.

## 4.2 Resposta do biossensor

Após a seleção do método mais adequado para a imobilização da enzima L-Asnase na superfície do eletrodo impresso de carbono, foi verificada a resposta do dispositivo em solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0, antes e após a adição do anti-Asnase. Os resultados dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos estão apresentados na Figura 10.

**Figura 10.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para verificação da viabilidade do método em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



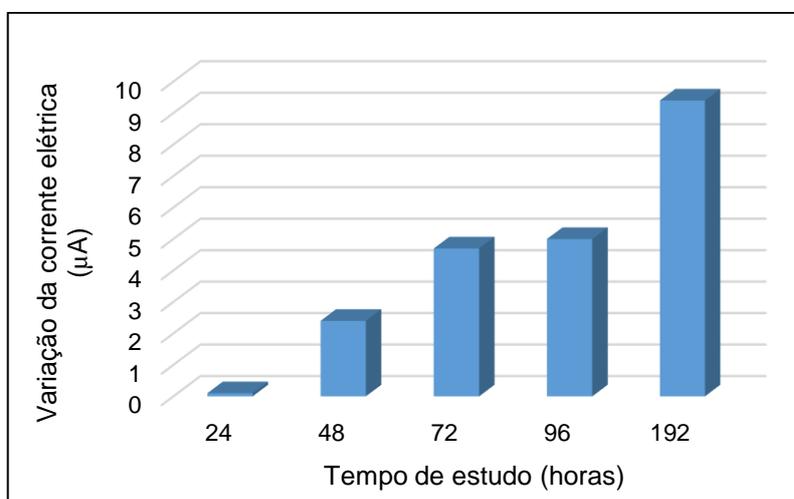
Analisando a Figura 10 é possível verificar que, na presença da L-Asnase, o valor da corrente é mais elevado que após a adição do anticorpo, evidenciando a diminuição da taxa de transferência de elétrons, devido ao aumento da espessura da biocamada (ZANATO *et al.*, 2017), formada pela interação entre os imunocompostos. Dessa forma, a proposta de monitoramento do anticorpo envolvendo o biossensor se mostrou viável. Assim, prosseguiu-se com os estudos da otimização das condições experimentais, para selecionar as condições em que a resposta do dispositivo era máxima, visando obtenção de um biossensor com alta sensibilidade.

### 4.3 Tempo de interação entre nanocompósito e a L-Asnase

Para melhor desempenho do biossensor, a enzima L-Asnase foi imobilizada através de ligações covalentes cruzadas sobre o nanocompósito ativado com glutaraldeído. Para que ocorresse as ligações entre os grupos reativos terminais da enzima e os grupos reativos terminais do glutaraldeído, foi necessário deixá-los em interação por determinado tempo. Os tempos estudados foram, 24; 48; 72; 96 e 192

horas. Para cada tempo estudado foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial antes e após a adição do anticorpo, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0. As variações da corrente elétrica para cada tempo estudado são apresentadas na Figura 11.

**Figura 11.** Resultados da variação de corrente elétrica obtidos em cada tempo de estudo da interação entre o nanocompósito e a enzima, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Para melhor avaliação dos resultados, os dados obtidos na Figura 9 são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Correntes elétricas obtidas no estudo de tempo de interação entre nanocompósito e a L-Asnase antes e após a adição do anticorpo e suas respectivas variações.

Tempo de estudo (horas)	Corrente antes adição do anti-Asnase (I/μA)	Corrente após adição do anti-Asnase (I/μA)	Variação de corrente (I/μA)
24	70,4	70,3	0,1
48	56,6	54,4	2,2
72	63,8	59,1	4,7
96	67,1	62,1	5,0

192

71,7

62,3

9,4

---

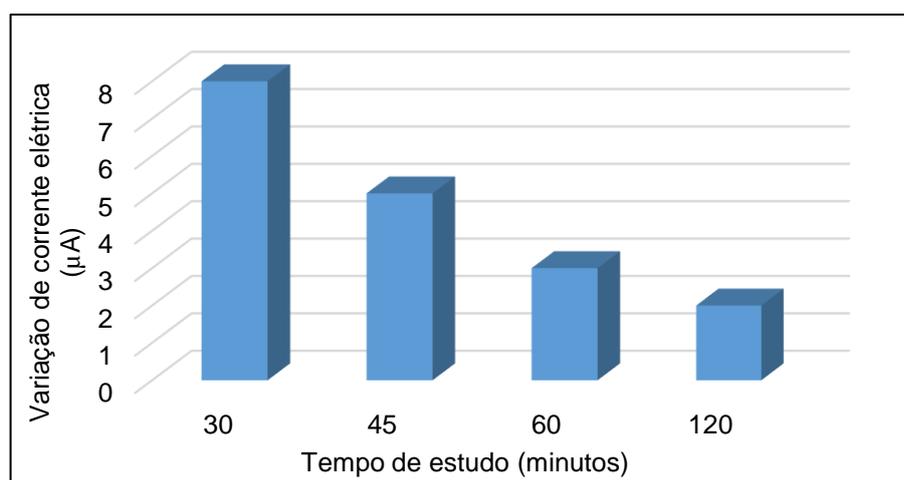
Analisando-se os resultados apresentados na Figura 11 e na Tabela 1, é possível perceber que a interação entre a enzima e suporte no período de 24 h não foi suficiente para a imobilização enzimática, pois não houve queda de corrente elétrica significativa nesse tempo. A partir do tempo de 48 horas é possível observar que a imobilização da L-Asnase começa se tornar eficiente, ocorrendo uma variação de corrente elétrica de 2  $\mu\text{A}$ , bem como incremento na variação da corrente com o passar das horas. Segundo Mateo *et al.* (2007), o processo de imobilização pode ser lento e dependente do tempo, uma vez que o suporte de imobilização pode se ligar à enzima em vários pontos.

Neste sentido, o tempo em que ocorreu a maior imobilização da enzima na superfície do suporte foi o de 192 horas. Tempos acima deste não foram testados devido inviabilidade no processo por ser tornar muito demorado. Portanto, foi usado nos experimentos subsequentes o tempo de 192 horas.

#### **4.4 Tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo**

Foi realizado também o estudo do tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima imobilizada e a superfície do eletrodo, a fim de aumentar a estabilidade e a confiabilidade do dispositivo. Os tempos estudados foram: 30; 45; 60 e 120 minutos. Para cada tempo estudado foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial antes e após a adição do anticorpo, em solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0. Os resultados de variação da corrente elétrica para cada tempo estudado são apresentados na Figura 12.

**Figura 12.** Resultados da variação de corrente elétrica obtidos em cada tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0, amplitude de pulso de 25 mV e  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Para melhor avaliação, os resultados obtidos na Figura 12 são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Correntes elétricas obtidas no tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo antes e após a adição do anticorpo e suas respectivas variações.

Tempo de estudo (minutos)	Corrente antes adição do anti-Asnase (I/μA)	Corrente após adição do anti-Asnase (I/μA)	Variação de corrente (I/μA)
30	67,1	58,4	8,7
45	64,5	59,1	5,4
60	67,2	63,7	3,5
120	67,0	64,6	2,4

Observa-se pelas Figura 12 e Tabela 2 que, conforme ocorreu o incremento no tempo de estudo, houve redução na variação de corrente elétrica, evidenciando diminuição da formação do imunocomplexo na superfície do eletrodo de trabalho. Desta forma, no tempo de 30 minutos o biossensor apresentou melhor desempenho. Além disso, ressalta-se que foi realizado estudo no tempo de 20 minutos, entretanto, neste tempo verificou-se que a interação entre o nanocompósito e a superfície do eletrodo não foi estável, pois o nanocompósito foi lixiviado da superfície do eletrodo no primeiro processo de lavagem.

Estudos desenvolvidos relataram alterações nas características de polímeros, como a quitosana, quando ocorre evaporação de solventes, como a viscosidade (relacionada com a dimensão da molécula do polímero), e interações existentes entre partículas do sistema (SRINIVASA *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2009). Desta forma, diante dos resultados apresentados, sugere-se uma possível mudança de conformação ou alteração na composição da quitosana com a evaporação de solvente. Em maiores tempos, a evaporação do solvente também se torna mais efetiva. Assim, acredita-se que esta alteração conformacional prejudica a imobilização da enzima na superfície do biossensor, com conseqüente diminuição da variação da corrente elétrica antes e após a adição do anticorpo.

#### **4.5 Estudo de pH para imobilização da L-Asnase**

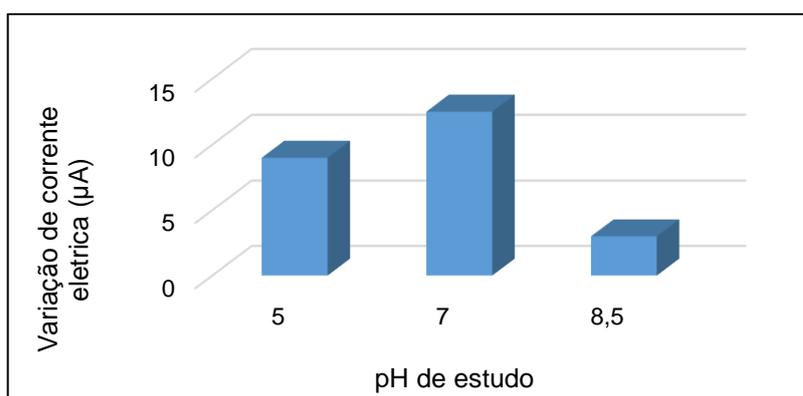
Uma das otimizações do biossensor foi a determinação do pH utilizado, na imobilização da enzima, que proporcionasse a melhor resposta.

A reação entre a enzima e o glutaraldeído é fortemente influenciada pelo pH, força iônica da solução, tempo de reação, entre outros fatores. Ressalta-se que suportes de imobilização constituídos por glutaraldeído, geralmente apresentam maior estabilidade em pHs próximo à neutralidade. Por outro lado, valores elevados de pH podem tornar mais efetiva a reação entre o grupo carbonila presente no glutaraldeído e os grupos nucleofílicos presente na enzima (WALT; AGAYN, 1994; BETANCOR *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009). Encontrou-se na literatura trabalhos que realizaram a imobilização da enzima L-Asnase em diferentes suportes ativados por glutaraldeído. Na maioria dos mesmos, para a imobilização enzimática, foi verificado uso de pHs entre 7,0 à ligeiramente básico (BALCÃO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004; AGRAWAL

*et al.*, 2018). Entretanto, é salientado que os resultados obtidos nos trabalhos relatados anteriormente estão fortemente relacionados às suas condições experimentais, de modo que, neste estudo foi analisada uma faixa de pH baseada nas informações acima.

Os pHs avaliados foram: 5,0, 7,0 e 8,5. Em cada pH obteve-se voltamogramas de pulso diferencial antes e após a adição do anticorpo, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Os resultados da variação de corrente elétrica obtidos para cada pH estão apresentados na Figura 13.

**Figura 13.** Resultados da variação de corrente elétrica obtidos em cada pH de estudo para imobilização da L-Asnase, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Amplitude de pulso de 25 mV e  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Para melhor avaliação, os resultados obtidos na Figura 13 são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Correntes elétricas obtidas no estudo de pH para imobilização da L-Asnase antes e após a adição do anticorpo e suas respectivas variações.

pH	Corrente antes adição do anti-Asnase (I/µA)	Corrente após adição do anti-Asnase (I/µA)	Variação de corrente (I/µA)
5,0	66,0	56,7	9,3
7,0	63,8	51,3	12,5

8,5

59,8

56,5

3,3

---

Ao analisar a Figura 13 e a Tabela 3 é possível verificar que a melhor resposta foi obtida em pH 7,0. Observou-se durante a etapa de lavagem do eletrodo, para a retirada do excesso de nanocompósito modificado que não aderiu à sua superfície, que quanto maior o pH de estudo, menor a adsorção do suporte à superfície. Pois, visivelmente, com o aumento do pH, uma maior quantidade de nanocompósito modificado acabou sendo retirada no momento da lavagem. Devido a isso, no pH 8,5, parte do suporte depositado na superfície eletródica foi lixiviado no momento da lavagem, mesmo tomando-se o devido cuidado. Com isso, observou-se influência do pH também na interação entre o nanocompósito modificado e superfície do eletrodo. Além disso, ressalta-se que, mesmo nesse pH, houve maior dificuldade no momento da lavagem. O procedimento e as condições experimentais realizadas foram as mesmas para todos os biossensores construídos nesse estudo.

Em relação aos resultados obtidos, soluções tamponadas em pHs elevados contendo glutaraldeído por um período prolongado podem prejudicar a imobilização enzimática, uma vez que reduz a quantidade de ligações entre enzima e glutaraldeído. Além disso, pHs elevados favorecem a polimerização do glutaraldeído (MIGNEAULT, *et al.*, 2004). Neste estudo, embora os monômeros da molécula estivessem adsorvidos em nanopartículas magnéticas, nos pHs mais elevados, sugere-se uma interação mais forte entre as próprias moléculas do glutaraldeído, disponibilizando menos grupos funcionais para ligação com a enzima. Já em pHs ligeiramente ácidos à neutros, a ligação entre grupos funcionais do glutaraldeído e da enzima são instáveis (MIGNEAULT, *et al.*, 2004).

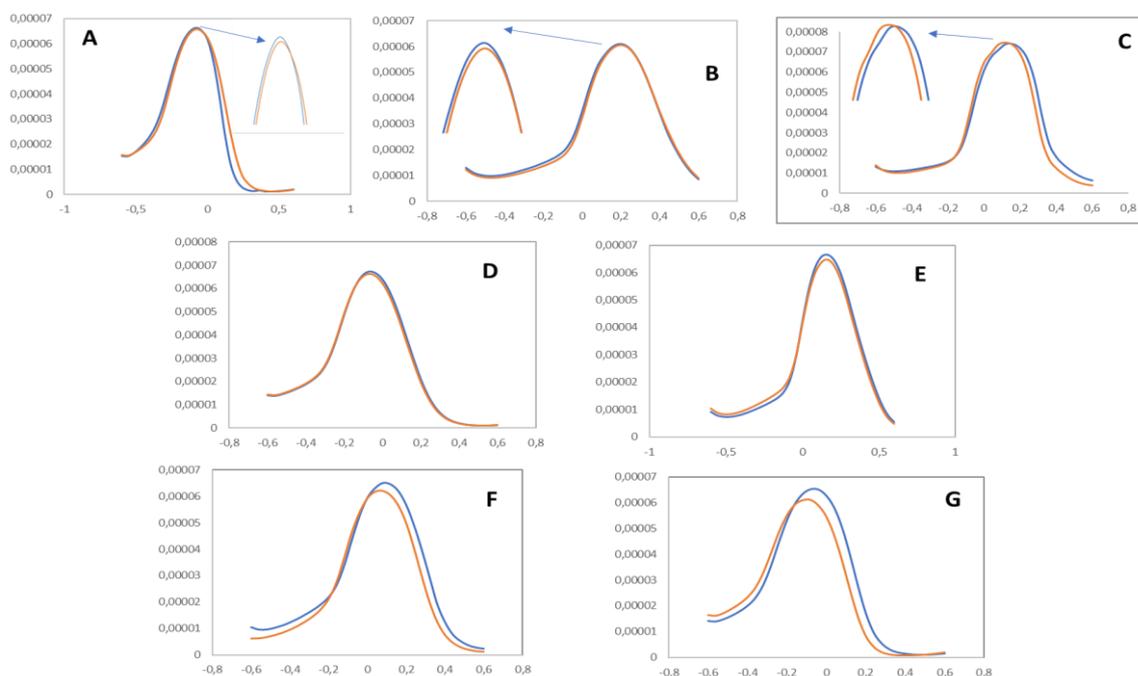
#### 4.6 Curva Analítica do biossensor

Após a otimização das condições experimentais, foram obtidos os parâmetros analíticos com o biossensor, primeiramente, foi verificada a diferença de corrente obtida com o biossensor sob influência de diferentes concentrações do anticorpo anti-Asnase no sistema. As concentrações verificadas foram: 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 7,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As medidas

foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial, com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. A Figura 14 (A-G) apresenta os voltamogramas obtidos em cada concentração avaliada.

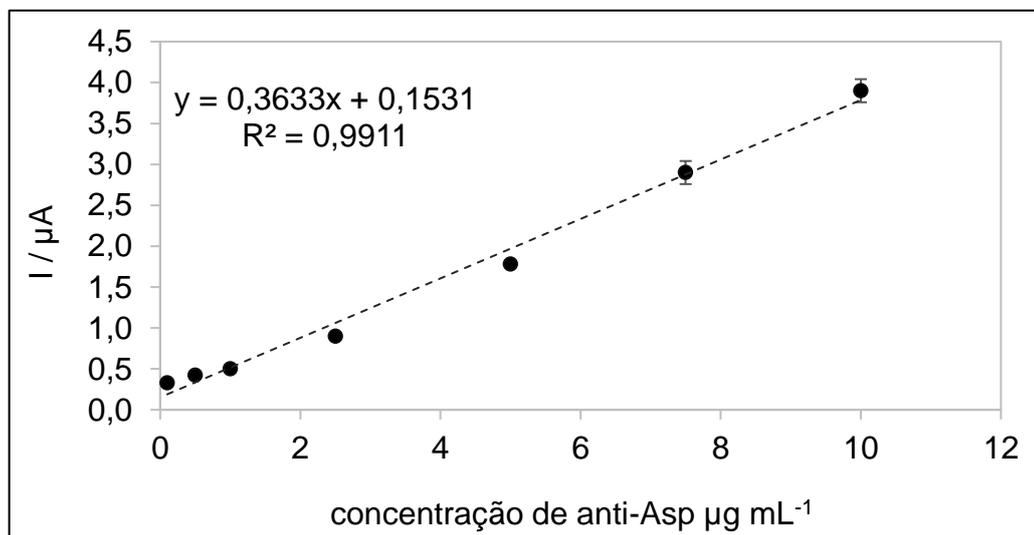
Ressalta-se que concentrações maiores que 10 µg.mL<sup>-1</sup> de anticorpo foram testadas, no entanto, observou-se um aumento do sinal após a adição do analito. Neste caso, sugere-se que tal concentração é muito elevada para o sistema, de forma que, devido à forte interação entre a ligação antígeno-anticorpo, a enzima é retirada da superfície do eletrodo, diminuindo o bloqueio da transferência de elétrons causado pelo biocamada, com conseqüente aumento da corrente elétrica.

**Figura 14.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o biossensor em diferentes concentrações de anti-Asnase (A: 0,1 µg mL<sup>-1</sup>; B: 0,5 µg mL<sup>-1</sup>; C: 1,0 µg mL<sup>-1</sup>; D: 2,5 µg mL<sup>-1</sup>; E: 5,0 µg mL<sup>-1</sup>; F: 7,5 µg mL<sup>-1</sup>; G: 10 µg mL<sup>-1</sup>) usando solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,05 mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>.



Através dos dados obtidos na Figura 14 foi possível a construção da curva analítica correspondente, assim como a obtenção do desvio padrão de cada medida realizada (duplicata). A Figura 15 apresenta a curva analítica obtida.

**Figura 15.** Curva analítica obtida com o biossensor em diferentes concentrações de anti-Asnase usando solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$  e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Através da curva analítica apresentada na Figura 15 percebe-se que o biossensor proposto apresentou resposta satisfatória com a variação da concentração de anti-Asnase no sistema. Além disso, apresentou linearidade entre  $0,1$  a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e, após esses valores não se observou-se mais queda na corrente. A equação da reta correspondente está na Equação 1.

$$y(\mu\text{A}) = 0,3633x (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}) + 0,1531 (R^2 = 0,9911) \quad \text{Eq. 1}$$

A partir da curva analítica foi possível também calcular o limite de detecção do biossensor para anti-Asnase. O referido valor foi de  $150 \text{ ng.L}^{-1}$  e um limite de quantificação de  $450 \text{ ng.L}^{-1}$  (usando  $3.3 s_d/b$  e  $10 s_d/b$ , respectivamente, sendo  $s_d$  o desvio padrão de 10 medidas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva).

Por se tratar de um dispositivo ainda não encontrado na literatura, foi possível a comparação apenas com o limite de detecção encontrado por Aubé *et al.* (2016), que obtiveram  $0,5 \text{ nmol.L}^{-1}$  como limite de detecção para o biossensor óptico proposto pelos autores.

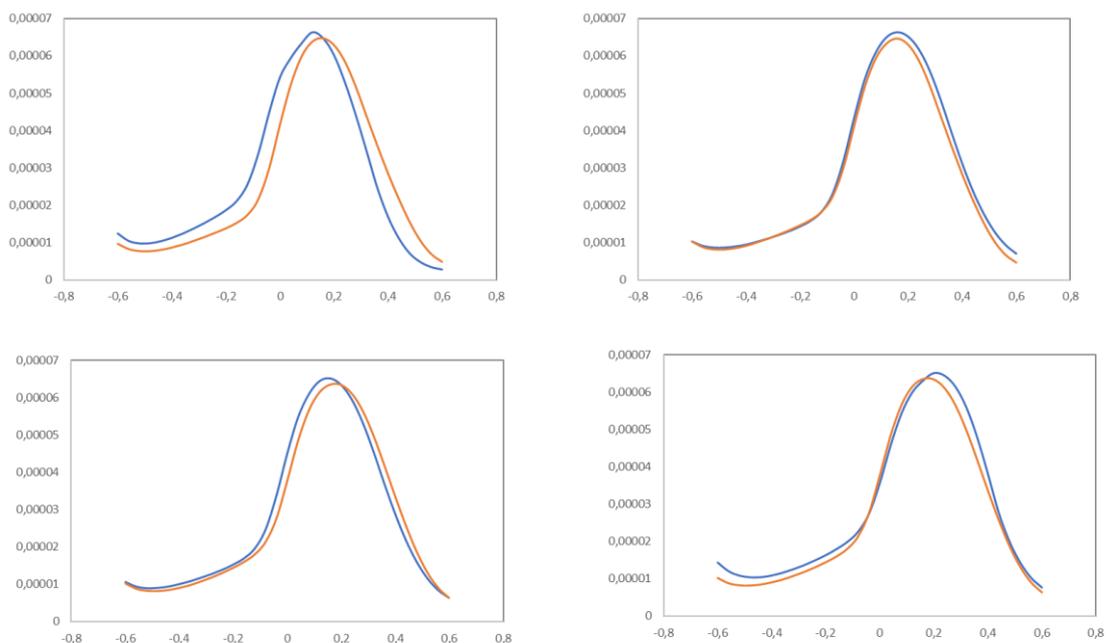
No entanto, dados da literatura envolvendo outros biossensores eletroquímicos para a detecção de anticorpos, apresentam regiões lineares similares as encontradas com o biossensor proposto. Zhou *et al.* (2003) desenvolveram um biossensor amperométrico baseado em carbono vítreo modificado com Nafion para imobilizar o antígeno e determinar o anticorpo anti-*Schistosoma japonicum*. Os autores descrevem que para os ensaios foi utilizado análise competitiva, também obtendo resposta linear na magnitude de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,05 a  $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Também usando análise competitiva, Kreuzer *et al.* (2001) para a determinação de anticorpos de alergia usando eletrodo impresso de carbono, respondendo linearmente entre 0,063 e  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em outro estudo, envolvendo o método eletroquimiluminescente para a detecção do anticorpo anti-glutamato descarboxilase, nanopartículas de ouro foram usadas como suporte para imobilização do antígeno. O biossensor apresentou uma faixa linear entre 0,30 a  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  (MA *et al.*, 2018), usando luminol na detecção.

Não foram encontrados muitos biossensores eletroquímicos para a detecção de anticorpos na literatura, o mais comum é a imobilização de anticorpos para a determinação dos antígenos correspondentes. Dessa forma, destaca-se a inovação do biossensor proposto, pois não usa análise competitiva, é detecção direta, e também não utiliza substâncias de revelação como o luminol, além de sua simplicidade e miniaturização. Além disso, o dispositivo proposto poderá auxiliar no acompanhamento do tratamento da leucemia, permitindo que sejam tomadas decisões mais rápidas sobre o uso da enzima L-Asnase no paciente.

#### **4.7 Análise da reprodutibilidade de construção do biossensor**

A reprodutibilidade de construção dos biossensores é um parâmetro analítico relevante, pois indica se o método usado na confecção dos dispositivos produz respostas confiáveis. Para isso, foram construídos quatro biossensores nas mesmas condições experimentais, sendo todos avaliados com a mesma concentração de anti-Asnase:  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram realizadas medidas antes e após a adição do anticorpo na referida concentração. A Figura 16 apresenta os voltamogramas correspondentes.

**Figura 16.** Voltamogramas obtidos na análise de reprodutibilidade do biossensor, utilizando a concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase em solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$  e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ .



A partir da Figura 16, construiu-se a Tabela 4 para melhor verificação dos resultados obtidos.

**Tabela 4.** Correntes elétricas obtidas antes e após a adição do anticorpo e suas respectivas variações para os quatro biossensores construídos para avaliação da reprodutibilidade do dispositivo.

Biossensor	Corrente antes da adição do anticorpo ( $\text{I}/\mu\text{A}$ )	Corrente após da adição do anticorpo ( $\text{i}/\mu\text{A}$ )	Varição da entre as correntes obtidas antes e após a adição do anti-Asnase ( $\text{I}/\mu\text{A}$ )
1	66,4	64,7	1,7
2	65,1	63,3	1,8
3	65,1	63,3	1,8
4	66,4	64,7	1,7

Dessa forma, a partir dos resultados da Tabela 4, foi obtido o coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 2:

$$CV = \frac{s}{x} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 2}$$

Onde  $s$  corresponde ao desvio padrão das medidas e  $x$  a média da variação de corrente ( $n=4$ ).

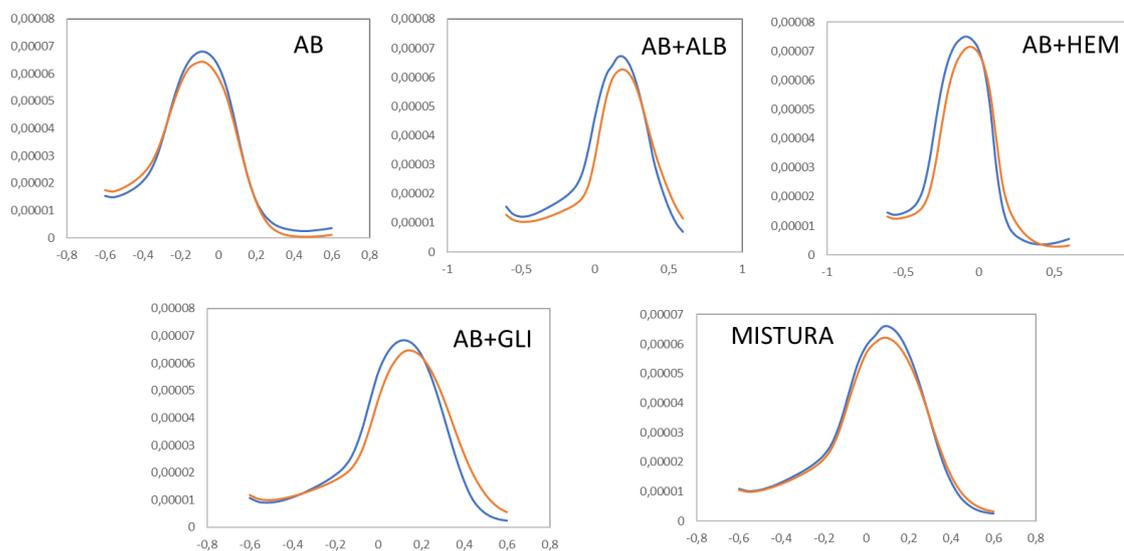
Os resultados mostram um coeficiente de variação de 3,3%, indicando que o método usado para construção do biossensor apresenta-se adequado e reprodutível, uma vez que o erro associado às medidas obtidas é considerado baixo (menor que 5%).

#### **4.8 Análise de seletividade do biossensor**

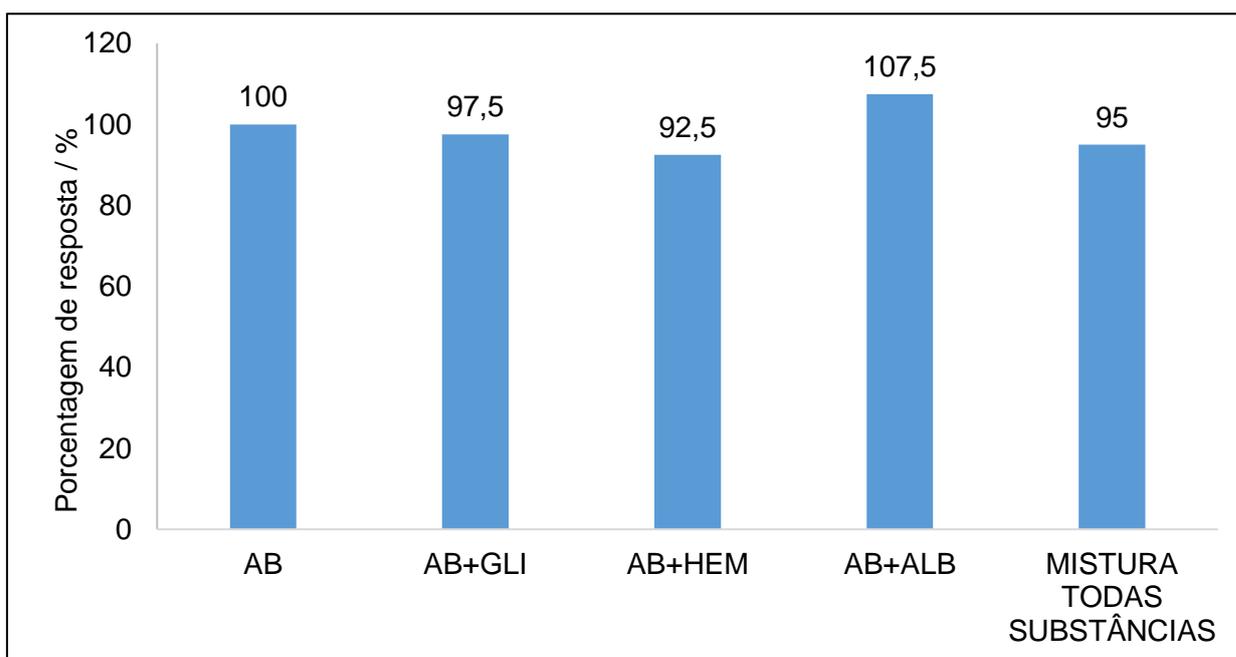
Com o propósito de verificar a seletividade, um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento deste tipo de dispositivo, foi avaliada a contribuição no sinal ou interferência, produzida por algumas substâncias com possibilidade de serem encontradas no sangue. Tais substâncias foram: glicose (GLI), hemoglobina (HEM) e albumina (ALB), sendo todas na concentração  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para isso, foram construídos 5 biossensores utilizando a mesma concentração de anti-Asnase (AB). As biomoléculas foram avaliadas de forma isolada e em conjunto. A leitura antes e após a adição das biomoléculas, foi monitorada. A resposta obtida com o biossensor sem a presença das biomoléculas foi assumida como 100%. A Figura 17 apresenta os voltamogramas obtidos e a Figura 18 a comparação dos resultados.

**Figura 17.** Voltamogramas de pulso diferencial obtido com biossensor para anti-Asnase na presença de outras substâncias, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ .



**Figura 18.** Estudo da seletividade do biossensor para anti-Asnase na presença de outras substâncias, em solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0.



Observando a Figura 18, é possível verificar que as demais substâncias analisadas têm efeitos desprezíveis na resposta do biossensor para detecção de anti-Asnase, sendo que o sinal da hemoglobina foi o que mais afetou a corrente (92,5%). Porém, ainda assim, sua interferência pode ser considerada pouco significativa (abaixo de 10%), indicando que o dispositivo apresenta alta seletividade e que pode ser satisfatoriamente aplicado na determinação deste importante anticorpo em amostras reais.

#### 4.9 Aplicação do biossensor em amostra preparada

Após obtenção da curva analítica, foi possível verificar a exatidão do biossensor por meio da aplicação do biossensor em amostra de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH fisiológico (7,4), contendo  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , fortificada com  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase. Dessa forma, foi obtida a corrente elétrica antes e após a adição da amostra fortificada. O estudo foi realizado em triplicata. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 5.** Correntes elétricas obtidas antes e após a adição da solução tampão fosfato em pH fisiológico (7,4) com presença de  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase e variação das respectivas correntes elétricas.

Biossensor	Corrente antes da adição do anticorpo (I/ $\mu\text{A}$ )	Corrente após da adição do anticorpo (I/ $\mu\text{A}$ )	Varição de corrente (I/ $\mu\text{A}$ )
1	66,4	64,7	1,7
2	65,1	63,3	1,8
3	65,1	63,3	1,8
<b>Média = 1,76 <math>\mu\text{A}</math></b>			

O valor da variação de corrente média foi substituído na equação da reta, obtendo-se uma concentração de  $4,42 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , cujo erro relativo foi calculado de acordo com a Equação 3:

$$ER = \frac{\text{valor encontrado} - \text{valor verdadeiro}}{\text{valor verdadeiro}} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

O erro obtido foi de 11,6%, considerado dentro do esperado em se tratando de biossensores. Provavelmente, em pH ajustado para o otimizado (7,0) o erro deve diminuir. Para aplicações em amostras de sangue, deve-se considerar a possibilidade de ser necessário ajuste do pH antes da medição com o biossensor.

Neste contexto, verificamos que o biossensor proposto pode ser considerado uma alternativa confiável para a determinação do anticorpo anti-Asnase em pacientes em tratamento para leucemia linfoblástica aguda. Dessa forma, a qualidade do tratamento prescrita ao paciente pode ser monitorada de maneira que o procedimento possa ser revisto precocemente pela equipe médica, em caso de necessidade.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a proposta de monitoramento do anticorpo anti-Asnase envolvendo o biossensor se mostrou viável, uma vez que ocorreu queda da corrente elétrica quando adicionado o analito ao biossensor. Em relação as otimizações, obteve-se: o tempo de interação entre nanocompósito e a L-Asnase de 192 horas, tempo de interação entre o nanocompósito modificado com a enzima e superfície do eletrodo de 30 minutos e pH 7,0 como o mais adequado para imobilização da L-Asnase. Os resultados mostram que o biossensor possui resposta linear entre as concentrações de 0,1 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de anti-Asnase, sendo possível calcular um limite de detecção de 150  $\text{ng.mL}^{-1}$ . Entretanto, não foi possível direta comparação dos resultados obtidos com os da literatura, uma vez que, não foram encontrados trabalhos que desenvolveram dispositivos eletroquímicos para determinação do anti-Asnase, destacando-se a inovação do presente trabalho.

Além disso, foi avaliada a reprodutibilidade do biossensor que apresentou um erro de 3,3% indicando que o dispositivo é construído de forma reprodutível. Em relação à seletividade, foi avaliada a possível interferência de substâncias presentes no sangue humano: a glicose, hemoglobina e albumina. A maior interferência apresentada ocorreu por parte da hemoglobina, no entanto, foi menor que 10%. Por fim, foi avaliada a exatidão do biossensor em solução tampão fosfato em pH fisiológico. O erro obtido foi de 11,6% e presume-se que ao ajustar-se para pH 7,0, o erro possa diminuir. Desta forma, chama-se atenção que possa haver necessidade de ajuste de pH de amostras de sangue antes da leitura no biossensor. Assim, verificou-se que o biossensor apresentou perspectivas favoráveis para uso no monitoramento do anticorpo anti-Asnase durante o tratamento de leucemia infantil.

No mais, visto o perfil inovador do presente trabalho, junto a possibilidade a melhoria da qualidade de vida de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA), e a obtenção dos resultados favoráveis apresentados, sugere-se a continuidade do mesmo até que possa ser aplicado em amostras reais de sangue e validado com ELISA, uma vez que o andamento e obtenção de tais resultados foi comprometido pelas restrições sanitárias devido a pandemia da COVID-19.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. *et al.* Catalytic characteristics and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 114, p. 504–511, 2018.
- ALBUQUERQUE, I. L. T. *et al.* Modificação da superfície de nanocompósitos de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> visando seu uso para imobilização da glicose oxidase. **Cerâmica**, São Paulo, v. 63, n. 366, p. 244-252, 2017.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. **REVISTA CHEMKEYS**. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, n. 3, 2003.
- ALVES C. *et al.* Diabetes Mellito Transitório Relacionado à Terapia Com L-Asparaginase. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 51, n. 4, 2007.
- ALVES, K. S. *et al.* Chitosan derivatives with thickening properties obtained by reductive alkylation. **Materials Science and Engineering: C**, n. 29, v. 2, p. 641–646, 2009.
- ANDRADE, R. O. Biossensores na medicina. Engenharia. Edição: 258, ag. 2017. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2017/08/18/biossensores-na-medicina/>>. Acesso em: 26 de maio de 2019.
- ATES, B. *et al.* Magnetic-propelled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–chitosan carriers enhance L-asparaginase catalytic activity: a promising strategy for enzyme immobilization. **The Royal Society of chemistry**, v. 8, p. 36063–36075, 2018.
- AUBÉ, A. *et al.* Response Monitoring of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing L-Asparaginase Therapy: Successes and Challenges Associated with Clinical Sample Analysis in Plasmonic Sensing. **ACS Sensors**, v. 1, n. 11, p. 1358-1365, 2016.
- BADJAGBO, K. *et al.* BTEX exposures among automobile mechanics and painters and their associated health risks. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 16, n. 2, p. 301-316, 2010.
- BALCÃO, V. M. *et al.* Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports, **Biotechnol. Prog.**, n. 17, p. 537–542, 2001.
- BALLESTEROS, C. A. S. *et al.* Nanostructured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> satellite gold nanoparticles to improve biomolecular detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 198, p. 377-383, 2014.
- BALLÓN COSSÍO, D. L-Asparaginasa, un arma de doble filo pero de vital importancia. **Rev. bol. ped.** La Paz, v. 53, n. 1, p. 24-28, 2014.
- BARROCAS, P. R. G. *et al.* Biossensores para o monitoramento da exposição a poluentes ambientais. **Cad. saúde colet.** Rio de Janeiro, v. 16 n. 4, 677 - 700, 2008.
- BETANCOR, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, **Enzyme and Microbial Technology**, n. 39, p. 877–882, 2006.
- BRAIEK, M. *et al.* An electrochemical immunosensor for detection of *Staphylococcus aureus* bacteria based on immobilization of antibodies on self-assembled monolayers-functionalized gold electrode. **Biosensors** v. 2, p. 417-426, 2012.
- BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J. Clin.** v. 68, p. 394-424, 2018.
- CAMPOS, E. A. *et al.* Synthesis, Characterization and Applications of Iron Oxide Nanoparticles - a Short Review. **J. Aerosp. Technol. Manag.**, São José dos Campos, v. 7, n. 3, p. 267-276, 2015.

- CANCELLI, D. M.; DIAS, N L. Brevê: uma metodologia objetiva de cálculo de emissões para a frota de veículos brasileira. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.1, n. 1, 2014.
- CARVALHO, R. M. *et al.* SPR: Uma nova ferramenta para biossensores. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.
- CAVALCANTI JUNIOR, G. B. Relevância clínica e biológica das alterações do gene e proteína p53 nas leucemias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 1, p. 75-76, 2005.
- CAZÉ, M. O. *et al.* Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev. HCPA**, v. 30, n. 1, p. 6-12, 2010.
- CHO, I. H. *et al.* Current technologies of electrochemical immunosensors: perspective on signal amplification. **Sensors**, v. 18, n. 1, p. 207, 2018.
- DAPPER, S. N. *et al.* Poluição do ar como fator de risco para a saúde: uma revisão sistemática no estado de São Paulo. **Estud. av.**, São Paulo, v. 30, n. 86, p. 83-97, abr. 2016.
- DIAS, F. S. *et al.* Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Quím. Nova**, v. 31, n. 1, p. 1678-7064, 2008.
- DUARTE, X. *et al.* Incidence and risk factors for Central Nervous System thrombosis in paediatric acute lymphoblastic leukaemia during intensive asparaginase treatment: a single-centre cohort study. **British journal of haematology**, v. 174, n. 2, p. 280-291, 2016.
- DUNAJOVÁ, A. A. *et al.* Ultrasensitive impedimetric immunosensor for influenza A detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 858, 2019.
- ELMAN, I. *et al.* Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 297-303, 2007.
- ENSAFI, A. A. *et al.* Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 24, p. 8176-8183, 2011.
- ENSAFI, A. A. *et al.* A novel diagnostic biosensor for distinguishing immunoglobulin mutated and unmutated types of chronic lymphocytic leukemia. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, 2016, p 409-415, 2016.
- FIGUEROLA, A. *et al.* From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n 2, p. 126-143, 2010.
- FURLANI, I. *et al.* Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Quím. Nova**, v. 43, n. 4, p. 1678-7064, 2020.
- FRANCISQUINE, E. *et al.* Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p. 269-289, 2014.
- GARG, A. *et al.* Study of seasonal and spatial variability among Benzene, Toluene, and p-Xylene (BTp-X) in ambient air of Delhi, India. **Pollution**, v. 5, n. 1, p. 135-146, 2019.
- GEE, S. H. *et al.* Synthesis and aging effect of spherical magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for biosensor applications. **Journal of Applied Physics**, v. 93, n. 10, 7560, 2003.
- GODOI, B. F. *et al.* Desenvolvimento de biossensor miniaturizado a base de tirosinase para detecção de clorofenol em águas naturais. **Rev. Bras. de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 6, n.2, p. 92-107, 2019.

GONSALVES, A. A. *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

HARRISON, C. J. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinics in Laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 631-647, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE Educa Jovens, 2021. Disponível em: < <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18313-populacao-rural-e-urbana.html#:~:text=De%20acordo%20com%20dados%20da,brasileiros%20vivem%20em%20%C3%A1reas%20rurais>>. Acesso em: 25 mai de 2021.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>. Acesso em: 22 de mai de 2019.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 11 mai. 2020.

JAMALI, A. A. *et al.* Nanomaterials on the road to microRNA detection with optical and electrochemical nanobiosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 24-42, 2014.

KERETETSE, G. S. *et al.* DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of African petrol attendants: a pilot study. **Annals of occupational hygiene**, v. 52, n. 7, p. 653-662, 2008.

KÖNIG, T. *et al.* Defects in oxide surfaces studied by atomic force and scanning tunneling microscopy. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 2, p. 1-14, 2011.

KUCHERYAVY, P. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents. **Langmuir**, v. 29, p. 710-716. 2013.

KUMAR, K.; WALIA, S. L-Asparaginase extracted from *Capsicum annum L* and development of asparagine biosensor for leukemia. **Sensors & Transducers Journal**, v. 144, n. 9, p. 192-200, 2012.

KUNDU, M. *et al.* Development of electrochemical biosensor based on CNT–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite to determine formaldehyde adulteration in orange juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 1829–1840, 2019.

KREUZER, M. P. *et al.* Development of an immunosensor for the determination of allergy antibody (IgE) in blood samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, p. 45-53, 2001.

LEITE, J. O. B.; PEREIRA, B. B. Doenças da pele relacionadas à poluição do ar: uma revisão sistemática. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 2017.

LIU, L. *et al.* Enhancement of oral bioavailability of salmon calcitonin through chitosan-modified, dual drug-loaded nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 557, p. 170-177, 2019.

MA, X. *et al.* A label-free electrochemiluminescent immunosensor for glutamate decarboxylase antibody detection on AuNP supporting interface. **Talanta**, v. 1886, p. 206-2014, 2018.

MANTOVANI, K. C. C. *et al.* Poluentes do ar e interações devido a doenças cardiovasculares em São José do Rio Preto, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 509-516, 2016.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

- MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.
- MAZLOUM-ARDAKANI, M. *et al.* A distinguished cancer-screening package containing a DNA sensor and an aptasensor for early and certain detection of acute lymphoblastic leukemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 497, p. 41-47, 2019.
- MELO, L. S. *et al.* Gases Poluentes derivados de veículos automotores no parque sólon de lucena. **Revista Campo do Saber**, v. 4, n. 4, 2018.
- MENDES, R. K. *et al.* Determination of Chlorophenol in Environmental Samples Using a Voltammetric Biosensor Based on Hybrid Nanocomposite. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, 1212-1219, 2017.
- MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quím. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MENDES, R. K. *et al.* Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, p. 164-172, 2008.
- MIGNEAULT, I. *et al.* Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques** n. 37, p. 790-802, 2004.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p 1981-8521, 2009.
- MOSCARDÓ GUILLEME, C. M. *et al.* Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **Anales de Pediatría**, v. 79, n. 5, p. 1-11, 2013.
- NURMI, J. T. *et al.* Characterization and Properties of Metallic Iron Nanoparticles: Spectroscopy, Electrochemistry, and Kinetics. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 5, p. 1221-1230, 2005.
- NURUNNABI, V. R. *et al.* Chapter 14 - Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system. **Nanostructures for Oral Medicine**, p. 409-433, 2017.
- OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar-Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.
- OLIVEIRA, J. E. *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8.1, p. 1-11, 2013.
- PATIL, M. P.; KIM, G. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n.1, p.79-92, 2016.
- PORFIRIO, F. F.O. *et al.* Biossensores e Bebidas-Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.
- RIBEIRO, C. B.; SCHIRMER, W. N. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16-22, 2017.
- SALOMÃO, P. E. A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 3, p. 1, 2018.
- SANTOS, V. A.; SILVA, C. A. A produção do espaço urbano e a qualidade do ar da cidade de Dourados (MS/BRASIL). **Revista de Geografia (Recife)**, v. 33, n. 4, 2016.

SARAIVA, D. C. A. *et al.* Tendência de mortalidade por leucemias em crianças e adolescentes nas capitais dos estados brasileiros: 1980-2015. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 1-13, 2018.

SCHRAUFNAGEL, D. E. *et al.* Air pollution and non-communicable diseases: a review by the forum of international respiratory societies' environmental committee. Part 2: air pollution and organ systems. **Chest**, 2019.

SCHÜZ, J.; ERDMANN, F. Environmental exposure and risk of childhood leukemia: an overview. **Archives of medical research**, v. 47, n. 8, p. 607-614, 2016.

SEIFI, M. *et al.* Exposure to ambient air pollution and risk of childhood cancers: A population-based study in Tehran, Iran. **Science of The Total Environment**, v. 646, p. 105-110, 2019.

SONG, E.; CHOI, J. W. Conducting Polyaniline Nanowire and Its Applications in Chemiresistive Sensing. **Nanomaterials**, v. 3, pg. 498-523, 2013.

SRINIVASA, P. C. *et al.* Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. **Journal of Food Engineering**, n. 63, v. 1, p. 79-85, 2004.

THÉVENOT, D. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics** v.16, p. 121–131, 2001.

TORRES, P. *et al.* Poluição atmosférica: breve revisão da situação em Portugal e os impactos na saúde pública. **Boletim Epidemiológico Observações**, v. 6, n. 19, p. 20-25, 2017.

TUAN, T. S. *et al.* Air pollutants and hospitalization due to pneumonia among children. An ecological time series study. Sao Paulo. **Medical Journal**, v. 133, n. 5, p. 408-413, 2015.

TUAN, T. S. *et al.* Efeitos da exposição a poluentes do ar no infarto agudo do miocárdio, segundo gêneros. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3, p. 216-222, 2016.

TUCCI, C. E. M. *et al.* Inundações urbanas na América do Sul. Ed. dos Autores, 2003.

VIDOTTI, M. *et al.* Biosensors Based on Gold Nanostructures. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2011.

VERMA, N. *et al.* E. coli K-12 Asparaginase-Based Asparagine Biosensor for Leukemia. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 35, p. 449-456, 2007.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, **ends in analytical chemistry**, v. 13, n. 10, P. 425-430, 1994.

WANG, S. *et al.* Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles–chitosan nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1781-1787, 2008.

WILSON, I. A.; STANFIELD, R. L. 50 Years of structural immunology. *Journal of Biological Chemistry*, v. 296, 2021.

XUAN VIET, N. *et al.* Development of highly sensitive electrochemical immunosensor based on single-walled carbon nanotube modified screen-printed carbon electrode. **Materials Chemistry and Physics** v. 227, p. 123–129, 2019.

YAO, H. *et al.* A Surface Acoustic Wave (SAW) biosensor method for functional quantification of E. coli l-asparaginase. **Talanta**, v. 203, n. 1, p. 9-15, 2019.

YU, Y. *et al.* Nickel nanoparticle-modified electrode for ultra-sensitive electrochemical detection of insulin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 215-219, 2016.

ZANATO, N. *et al.* Label-Free Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin T Based on Exfoliated Graphite Nanoplatelets Decorated with Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, n. 29, p. 1–9, 2017.

ZHANG, L. H. *et al.* Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes, **Biotechnol Lett**, n. 31, p. 1269–1272, 2009.

ZHANG, Y. Q. *et al.* Immobilization of l-asparaginase on the microparticles of the naturalsilk sericin protein and its characters, **Biomaterials**, n. 25, p. 3751–3759, 2004.

ZHOU, Y. *et al.* An amperometric immunosensor based on Nafion-modified electrode for the determination of schistosoma japonicum antibody. **Sensors and Actuators**, v. 89, p. 292-298, 2003.