



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**LUCIANA MARIA PONDÉ BASTIANELLIKNOP**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE LEITOR DE CIRCUITO INTEGRADO BIOCHIP  
READER DA PPC/mBio Inc. PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HIV/  
HCV: ANÁLISE PRELIMINAR DO MÉTODO**

**SALVADOR  
2011**

**APOIO:**



K72 Knop, Luciana Bastianelli.

Avaliação do Sistema de Leitor de Circuito Integrado *Biochip Reader* da PPC/mBio Inc. para o Diagnóstico de Infecção por HIV/HCV: Análise Preliminar do Método – Salvador, 2011.  
xi, 64 p.: il color.

Monografia apresentada ao Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, para a obtenção do Título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Roberto Badaró.

1. Doenças Transmissíveis – Diagnóstico. 2. Biossensores. I. Instituto de Ciência da Saúde - Universidade Federal da Bahia. II. Título

CDU 619.9/-079



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**LUCIANA MARIA PONDÉ BASTIANELLIKNOP**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE LEITOR DE CIRCUITO INTEGRADO BIOCHIP  
READER DA PPC/mBio Inc. PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HIV/  
HCV: ANÁLISE PRELIMINAR DO MÉTODO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Instituto de Ciência da Saúde - ICS - UFBA como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Imunologia da aluna Luciana Maria Pondé Bastianelli Knop  
Orientador: Prof. Dr. Roberto Badaró

SALVADOR  
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**LUCIANA MARIA PONDÉ BASTIANELLIKNOP**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE LEITOR DE CIRCUITO INTEGRADO BIOCHIP  
READER DA PPC/mBio Inc. PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HIV/  
HCV: ANÁLISE PRELIMINAR DO MÉTODO**

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2011

Banca Examinadora

---

---

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos especiais a Dr. Roberto Badaró; a Viviane Ferreira; a Dr. Sanjay Metha, pelas explicações e orientações dadas durante o estudo; a Dr. Cris Myatt, pelo material encaminhado; a Dr. Robert Schooley, pelas amostras e resultados fornecidos e a Dilcéia do PPGIm, suporte físico e espiritual de todo o Mestrado, pelo carinho e auxílio em todos os momentos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## RESUMO

O avanço tecnológico das últimas décadas nas técnicas dos imunodiagnósticos permitiu o desenvolvimento de métodos capazes de detectar o complexo antígeno-anticorpo com elevada eficiência e confiabilidade. Contudo, essas técnicas ainda não alcançaram um patamar de baixo custo, fácil manuseio, de resultado imediato para amostras múltiplas e de pessoal sem qualificação técnica para a aplicação dos testes. A Precision Photonic Corporation (PPC), juntamente com a mBio Inc. e em parceria com a Universidade de San Diego (UCSD), EUA, criaram um leitor de circuito integrado (*Biochip Reader*), baseado em arranjos multiplex para a detecção de multimarcadores biológicos a um só tempo, com a utilização de sistemas ópticos de baixo custo e fluorescência, rápido e de fácil manuseio. O objetivo deste estudo piloto, realizado na Bahia, em parceria com a Universidade Federal da Bahia (UFBA), foi o de avaliar a operacionalidade do sistema de leitor de circuito integrado (*Biochip Reader*), dos protocolos encaminhados e dos resultados dos testes multiplex para detecção de anticorpos contra HIV e HCV. Foram testadas 65 amostras que apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 100% quando comparadas com os resultados realizados por ELISA para HIV e HCV. Apesar disto, a análise sobre a operacionalidade do sistema, dos protocolos e dos resultados obtidos na Bahia apresentaram instabilidade das lâminas devido à susceptibilidade excessiva à umidade, formação de cristais e resíduos de trealose, excesso de etapas e manipulação das lâminas, e levarem a alterações dos protocolos. Portanto, apesar da similaridade dos resultados encontrados nos testes deste estudo-piloto quando comparado com os testes realizados por ELISA nos pacientes testados, o protótipo necessita de aprimoramento tecnológico, ampliação dos biomarcadores e mais experimentos de validação, a fim de que o sistema de biochip como uma ferramenta eficaz para o diagnóstico de doenças infecciosas seja inserido no mercado.

Palavras-chave: Biochip. Biossensor. HIV. HCV. Circuito Integrado. Sistema Óptico. Fluorescência.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## ABSTRACT

The technological advances in the immunodiagnostic techniques in recent decades have allowed the development of methods capable of detecting antigen-antibody complex with high efficiency and reliability. However, these techniques have not yet reached a level of low cost, easy handling, immediate results for multiple samples and do not require skilled person to implement the techniques. The Precision Photonic Corporation (PPC), with mBio Inc. and in partnership with the University of San Diego (UCSD), USA, have created a microchip reader (Biochip Reader), based on arrangements for multiplex detection of a multibiological markers using a low cost optical and fluorescence system, with fast results and easy handling. The aim of this pilot study, conducted in Bahia, in partnership with Federal University of Bahia (UFBA), was to evaluate the operability of the system (Biochip Reader), the routed protocols and results of multiplex tests for HIV and HCV antibodies detections. We tested 65 samples with a sensitivity and specificity of 100% compared with the results of ELISA for HIV and HCV. Nevertheless, the analysis on the operational system, the protocols and results presented in Bahia presents problems in the strips: excessive moisture, presence of crystals and trehalose residual, and the protocols showed excessive steps and strip handling. Therefore, despite the similarity found in this study with ELISA, the prototype requires technological development, extension and more biomarkers validation experiments, in order to this biochip system be inserted into the market as an effective tool for diagnosis of infectious diseases.

**Keywords:** Biochip. Biosensor. HIV. HCV. Integrated Circuit. Optical System. Fluorescence System.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema geral de funcionamento de um nanobiossensor. Os biorreceptores reconhecem e ligam-se aos analitos. A interação entre o analito alvo e o biorreceptor é concebida de forma a produzir uma perturbação bioquímica no nanobiossensor (ex: alteração pH) – transdução, que pode em seguida ser convertida num efeito detectável e mensurável, como um sinal elétrico. .... 25
- Figura 2.** Exemplo de um biossensor baseado no ensaio “sanduíche”, tomando por base o ELISA ..... 28
- Figura 3.** Tipos de transdutores mais usados: (a) ópticos; (b) eletroquímicos; (c) medidas de massa sensíveis; (d) térmicos ..... 28
- Figura 4.** A organização experimental básica de um sistema baseado no princípio de fluorescência de reflexão interna total (TIRF) ..... 32
- Figura 5.** Sistema de condutores de onda planar ..... 32
- Figura 6.** Modelo esquemático do *Biochip Reader* ..... 36
- Figura 7.** Representação esquemática de condutores de onda planar multimodo e o sistema de cartucho/lâmina ..... 38
- Figura 8.** (a) *Biochip Reader* utilizado neste estudo piloto; (b) tiras em microarranjos (biochip) previamente sensibilizadas ..... 39
- Figura 9.** Detalhamento do biossensor ..... 39
- Figura 10.** Protocolo 1 da PPC/mBio. Diagrama da disposição dos antígenos gp41 do HIV, *core* do HCV e controles positivos e negativos nas lâminas ..... 43
- Figura 11.** Protocolo 2 da PPC/mBio. Diagrama da disposição dos antígenos gp41 e gp120 do HIV, *core* e ns3 do HCV e controles positivos e negativos nas lâminas .... 44
- Figura 12.** Paciente HIV/HTLV positivos. Slide mostra paciente HIV positivo ..... 47
- Figura 13.** Paciente HIV, HCV e HTLV negativos. Slide mostrando paciente HIV/HCV negativos ..... 47



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



<b>Figura 14.</b> Paciente HIV/HCV positivo e HTLV negativo. Slide mostra paciente HIV/HCV positivo .....	47
<b>Figura 15.</b> Paciente HIV/HCV positivo e HTLV positivo. Slide mostra paciente HIV/HCV positivo .....	48
<b>Figura 16.</b> Paciente HCV/HTLV positivo. Slide mostrando paciente HIV negativo e HCV positivo .....	48
<b>Figura 17a.</b> Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Ocorreu falta de bloqueio na lâmina durante procedimento. Sinal para gp120 e controles positivos fracos .....	50
<b>Figura 17b.</b> Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal para gp120 e controles positivos fracos .....	50
<b>Figura 17c.</b> Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal controles positivos fracos; gp 120 com sinal normal .....	50
<b>Figura 18a.</b> Slide apresenta paciente AL HIV+. Ocorreu falta de bloqueio na lâmina durante procedimento. Sinal para gp120 fraco .....	50
<b>Figura 18b.</b> Slide apresenta paciente AL HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal para gp120 normal .....	50
<b>Figura 19.</b> Paciente RPC - HIV positivo,. Sinal para gp120 muito fraco .....	51
<b>Figura 20.</b> Paciente ESP - HIV positivo (coinfecção para citomegalovírus). Sinal para gp120 fraco .....	51
<b>Figura 21.</b> Paciente RTC - HIV positivo, TB disseminada. <i>Background</i> para controles negativos e HCV .....	51
<b>Figura 22.</b> Paciente EM - HIV/HCV/HTLV positivo. Notar gp120 fraco assim como <i>background</i> para os antígenos de HCV .....	51
<b>Figura 23.</b> A. Modelo esquemático do condutor de onda e o novo cartucho. B. Figura do novo <i>Biochip Reader</i> .....	58
<b>Figura 24.</b> Novo protótipo do biossensor da PPC/mBio .....	58
<b>Figura 25.</b> Protocolo de uso do novo cartucho .....	58



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Potenciais riscos biológicos de interesse .....	22
<b>Tabela 2.</b> Critérios do leitor de diodo a laser que atende ao protótipo do biochip da PPC .....	40
<b>Tabela 3.</b> Amostras testadas de pacientes HIV, HCV, HTLV negativos e positivos e coinfectados. ....	46
<b>Tabela 4.</b> Ocorrências com as lâminas encaminhadas pela PPC/mBio em setembro de 2010. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Tempo de exposição (ms) das lâminas - média, mediana, moda .....	49



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ARV – Antiretroviral therapy/ Terapia antirretroviral

AS – Anticorpo de superfície

ASV – Automated switching valve/Válvula de mudança automática

BaP – Benzo[a]pireno

BG – *Bacillus globigii*

BSA – Bovine serum albumin/Soro de albumina bovina

Camp - *Campylobacter*

CCD – Charge Coupled Device/Dispositivo de carga acoplada

CD – compact disc/Disco compacto

CD3 – Cluster of differentiation 3/Grupo de diferenciação 3

CD4 – Cluster of differentiation 4/Grupo de diferenciação 4

CD8 – Cluster of differentiation 8/Grupo de diferenciação 8

CFTR - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CMOS – Complementary Metal Oxide Semiconductor/Semicondutor complementar de óxido de metal

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

CV – Carga viral

DIEs – Doenças infecciosas emergentes

DNA – Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



DSTs – Doenças sexualmente transmissíveis

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid/Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEB – Enterotoxina estafilocócica

EH – *Erwinia herbicola*

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay/Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima

ENV – Envelope

ERI – Elemento de reflexão interna

EUA – Estados Unidos da América

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

FC – Flow cell/Célula de fluxo

FDA – Food and Drug Administration

GRIN – Graded index lens/Indicador de classificação de lentes

H – Hidrogênio

H1N1 – Vírus da Influenza A tipo H1N1

H5N1 – Vírus da Influenza A tipo H5N1

HBV – Hepatitis B virus/Vírus da hepatite B

HCV – Hepatitis C virus/Vírus da hepatite C

HIV – Human Immunodeficiency Virus/Vírus da imunodeficiência humana

HSV – Herpes Simplex Virus

HTLV – Human T Lymphotropic Virus/Vírus T-lymfofílico humano

HUPES – Hospital Universitário Professor Edgard Santos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



IC – Integrated circuit/Circuito integrado

IMG – Input manifold employing a gasket layer/Entrada múltipla empregada em camada de vedação

IOW - Integrated Optical Waveguides/condutores ópticos integrados de onda

K – Potássio

LAPI – Laboratório de Pesquisa em Infectologia

MAAB – Multi-Analyte Array Biosensor/Biossensor de múltiplos analitos em arranjo

mBio – Empresa Americana parceira da PPC

MEMS – Microelectromechanical systems/Sistema microeletromecânico

MFB – Multi-functional biochip/Biochip multifuncional

MPO – Mieloperoxidase

ms – milisegundo

MS2 – Vírus bacteriófago MS2

NOS – N-oxi-succinimida

NRL – Naval Research Laboratory

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – Protein 53

PBS – Phosphate buffered saline/Salina tamponada com fosfato

PBST – Phosphate Buffered Saline Tween/Salina tamponada com fosfato contendo Tween

PDMS – Polidimetilsiloxano

PEBBLE – Probes encapsulated by biologically localized embedding

pH – Potencial hidrogeniônico



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



PIP – Physically isolated patterning

POC – Point-of-care

PPC – Precision Photonics Corporation

QC – Quick connector/Conector instantâneo

RNA - Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

Sal – Samonella

SARS – Severe acute respiratory syndrome/síndrome respiratória aguda grave

SEB – *Staphylococcus Enterotoxin B*/ Enterotoxinas estafilocócicas do grupo B

SERS – Surface enhanced raman spectroscopy ou surface enhanced raman scattering

Shig – Shigella

SiO – Óxido de Silício

SPR – Surface plasmon resonance/Ressonância de superfície de plasma

SRM – Sample-reagent manifold/Múltiplos reagentes de amostras

SV – Sample vials/Frascos de amostras

TB – Tuberculose

TIR – Total internal reflection/Reflexão interna total

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence/Fluorescência por reflexão interna total

TMB – Tetrametilbenzidina

UCSD – University of California in San Diego/Universidade da Califórnia de San Diego

UDAI – Unidade Docente Assistencial de Infectologia



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



UFBA – Universidade Federal da Bahia

WG – Waveguide/condutor de onda

WHO – World Health Organization/Organização Mundial de Saúde



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



## SUMÁRIO

Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas .....	x
Lista de abreviaturas e siglas .....	xi
1. Introdução .....	19
2. Biossensores e Biochips .....	21
2.1. Histórico .....	21
2.2. Nanotecnologia .....	22
2.2.1. Nanossensores ópticos .....	23
2.2.2. Nanobiochips: <i>lab-on-a-chip</i> .....	23
2.3. Desenvolvimento dos biossensores .....	24
2.3.1. Classificação dos biossensores .....	25
2.3.1.1. Antígeno/anticorpo .....	26
2.3.2. Tipos de transdutores .....	28
2.3.2.1. Detecção óptica .....	29
2.4. A biomolécula para o reconhecimento molecular .....	30
2.4.1. Imobilização da biomolécula no condutor de onda .....	31
2.5. Biochips: sistemas ópticos e fluídicos em circuito integrado .....	31
2.6. Desenvolvimento dos leitores de biochips/biossensores ( <i>Biochip Reader</i> ) .....	34



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



2.6.1. Naval Research Laboratory (NRL).....	34
2.7. Aplicações dos biochips no diagnóstico clínico do HIV .....	35
3. Precision Photonics Corporation .....	36
3.1. Desenvolvimento do biossensor pela PPC .....	37
3.1.1. A plataforma de diagnóstico de baixo custo .....	37
3.1.2.. Do protótipo baseado do NRL ao sistema corrente .....	37
3.1.3. Método de preparação das unidades de biochips (cartões diagnósticos) ....	38
3.1.4. Preparação dos biochips e especificações .....	38
4. Objetivos .....	41
4.1. Objetivo principal .....	41
4.2. Objetivos específicos .....	41
5. Materiais e Métodos .....	42
5.1. Protocolo dos testes.....	42
5.1.1. Protocolo PPC/mBio .....	42
5.2. Análise dos dados e determinação do tempo de exposição .....	45
6. Resultados .....	46
6.1. Lâminas sensibilizadas com HIV/HCV .....	46
6.2. Avaliação dos protocolos .....	48
6.3. Análise dos dados .....	49
6.4. Tempo de exposição (protocolo 2).....	49
7. Discussão .....	52



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



8. Conclusão .....	57
9. Perspectivas Futuras .....	58
10. Referências .....	59

## 1. Introdução

As doenças infecto contagiosas são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo desde os tempos mais remotos e certamente são uma das mais preocupantes e frequentes na população humana (KNOP, 2007). Elas resistem ao tempo e apesar dos grandes avanços da medicina em termos diagnósticos ainda são responsáveis por uma em cada três mortes que ocorrem no mundo (WHO,2011).

Nas últimas décadas, o progresso tecnológico permitiu o desenvolvimento de métodos capazes de detectar o complexo antígeno-anticorpo com elevada eficiência e confiabilidade, através de técnicas imunológicas que revelam sensibilidade a antígenos (reações intradérmicas e percutâneas), presença de anticorpos ou antígenos no organismo, como nos testes de imunoprecipitação, aglutinação, fixação do complemento, ou imunoenaios que utilizam marcadores da interação antígeno-anticorpo com conjugados ligantes (imunofluorescência, radioimunoensaio, ensaios imunoenzimáticos, imunofluorimétricos e quimioluminescência) (VAZ et al., 2007). Contudo, esses testes imunodiagnósticos ainda requerem profissionais especializados para a realização e interpretação dos métodos, local adequado para seu processamento, materiais e reagentes específicos e ainda demandam tempo para a determinação do resultado e posterior liberação do mesmo ao paciente.

No intuito de criar testes para diagnósticos clínicos rápidos, de baixo custo, sem a necessidade de pessoal especializado para a realização dos mesmos e com pouco material biológico, a Precision Photonic Corporation (PPC), juntamente com a Universidade de San Diego (UCSD), EUA, estão aprimorando um leitor de biochips, tecnologia baseada em microarranjos, com um sistema de leitor de circuito integrado e na fotônica, para o diagnóstico rápido e de baixo custo de inúmeras doenças infecciosas, além de contagem de células T CD4+, ácidos nucleicos, DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico, RNA (do inglês, *ribonucleic acid* - ácido ribonucleico), entre outros. Estas duas entidades juntaram-se à Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil, para parte da realização do projeto, sendo que o trabalho desenvolvido aqui consiste particularmente na aplicação desta nova técnica no diagnóstico do HIV e suas coinfeções.

O diagnóstico laboratorial e o manejo clínico de indivíduos infectados pelo HIV é significativamente relevante se esse diagnóstico laboratorial pudesse ser feito simultaneamente ao subconjunto de coinfeções mais comuns que acometem pacientes

HIV positivos ou aqueles em risco de desenvolvimento da AIDS. Infelizmente, o diagnóstico do HIV e coinfeções é hoje realizado por uma série de exames paralelos que acabam se tornando caros, especialmente em regiões de poucos recursos. A pesquisa e desenvolvimento realizados neste trabalho permitirão a utilização de testes de baixo custo, fáceis de manusear no pronto-atendimento, o que irá ajudar na avaliação do *status* da doença de pacientes com AIDS e suas coinfeções, em particular em locais com recursos limitados. A simplicidade e o baixo custo dessa tecnologia vão facilitar o uso da terapia antirretroviral, prolongando muito a vida das pessoas infectadas com o HIV e reduzindo a carga de doença em populações onde o HIV é endêmico.

## 2. Biossensores e Biochips

### 2.1. Histórico

As descobertas e inovações ocorridas nos métodos diagnósticos e na imunologia ao longo dos dois últimos séculos foram preponderantes para a construção da base dos princípios imunodiagnósticos dos biossensores e biochips atualmente utilizados (D'ORAZIO, 2011), a exemplo de: Elie Metchnikoff (1845-1916) que observou e descreveu a ação dos fagócitos, formulando a teoria fagocitária da imunidade; Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato que demonstraram a presença de antígenos e anticorpos no sangue periférico de pessoas portadoras de doenças infecciosas em 1890, quando descreveram a atividade de anticorpos contra as toxinas diftérica e tetânica (CUKOR, 1973; DEREK, 2007a, 2007b; CUKOR, 1973); Paul Ehrlich que anuncia a teoria da ligação dos anticorpos a receptores celulares chamados de antígenos em 1897 (RAMON, 1963; SILVERSTEIN, 2002); Michael Heidelberger e Oswald Avery que introduzem definitivamente o conceito da ligação antígeno-anticorpo, demonstrando que juntos formavam precipitados (HEIDELBERGER, 1939, 1951); Peter Perlmann e Eva Engvall que, em 1971, através da reação da enzima com o seu substrato específico na descoberta da reação cromogênica da fosfatase e da peroxidase com alguns substratos, tais como a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina ou TMB, produzindo uma coloração azul, utilizaram um sistema de fixação do antígeno em uma fase sólida, criando, assim, a mais utilizada tecnologia para detecção de antígenos e/ou anticorpos no diagnóstico biológico: o ELISA (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay* - ensaio imunoabsorvente ligado a enzima) (ENGVALL *et al.*, 1971, 1972). Com o desenvolvimento do ELISA, as pesquisas biológicas e os testes diagnósticos mudaram sua direção de princípio: da técnica para demonstração do complexo antígeno-anticorpo para os ensaios imunoenzimáticos (ENGVALL *et al.*, 1971, 1972).

Contudo, somente no final do século XX e início do século XXI, com o desenvolvimento da miniaturização dos componentes elétricos na indústria do semicondutor, com os avanços da nanotecnologia, levando a uma redução enorme de custos, a um maior desempenho e a uma forte disseminação dos circuitos integrados, que estudos abrangendo os avanços tecnológicos da bioquímica e da ciência do semicondutor começaram a render resultados produtivos na criação e reprodução de biochips, biossensores e leitores, inaugurando uma nova era no processamento de analitos biológicos (KNOP, 2007).

Inicialmente, a intenção principal do desenvolvimento do sistema de biochips e biossensores foi direcionada para a detecção de toxinas e venenos utilizados no

bioterrorismo (FORUM ON MICROBIAL THREATS, 2006). E isto se deu tendo em vista a capacidade que um biossensor possui em poder identificar adequadamente uma grande variedade de substâncias em amostras, alimentos ou na água, através de uma multianálise, rápida e precisa. Alguns exemplos dessas substâncias estão apresentadas na Tabela 1 (XERRI, 2003). Contudo, hoje, a tecnologia dos biochips e biossensores e o desenvolvimento dos mesmos estão sendo amplamente aplicados em todas as áreas da ciência humana. E para que isto fosse possível a participação da nanotecnologia foi fundamental.

**Tabela 1.** Potenciais riscos biológicos de interesse.

<b>Tipo</b>	<b>Espécies</b>
Proteína	Toxina da cólera, Enterotoxina Estafilocócica (EEB), toxina botulínica, aglutinina II de <i>Ricinus communis</i> (Ricina)
Bactéria (anthrax), <i>pestis</i> (F1 spp.	<i>Francisella tularensis</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia</i> é um antígeno), <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.
Vírus	Hepatite, rotavírus, grupo de vírus Norwalk

Fonte: Os exemplos foram obtidos no site <http://www.cfsan.fda.gov/mow/intro.html> da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, 2007).

## **2.2. Nanotecnologia**

A nanotecnologia engloba diversas áreas científicas multidisciplinares, integrando as ciências físicas, engenharia molecular, biologia, biotecnologia e a química, tendo como base a miniaturização e criação de materiais, dispositivos e sistemas através da manipulação de matéria à escala do nanômetro (nm) - nano-escala, ou seja, um milionésimo de milímetro ou um bilionésimo do metro (MOHAPATRA *et al.*, 2011; D'ORAZIO, 2011). A nanotecnologia tem avançado em áreas como: tecnologias da informação e comunicação, robótica, materiais, medicina e biotecnologia (D'ORAZIO, 2011).

A nanotecnologia abriu portas para a possibilidade de poder se detectar e manipular parâmetros bioquímicos e moleculares através de dispositivos à nano escala - nanodispositivos, como biossensores, nanobiossensores e nanobiochips, tais como:

sensores de nanofios, nanobiossensores de canais iônicos, nanobiossensores virais, nanobiossensores PEBBLE (do inglês, *probes encapsulated by biologically localized embedding*), nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e nanofios acoplados à eletroquímica e transdutores ópticos, nanobiossensores tipo cantilever, sensores Nanoshell, e em especial os nanobiossensores ópticos (CHA *et al.*, 2011).

A miniaturização desses dispositivos está proporcionando uma dramática melhoria na rapidez, precisão e sensibilidade dos resultados de exames bioquímicos e biomoleculares, como uma maior acessibilidade e flexibilidade dos mesmos (MOHAPATRA *et al.*, 2011; D'ORAZIO, 2011).

### 2.2.1. Nanobiossensores ópticos

Muitos dos nanossensores atualmente comercializados baseiam-se nas propriedades ópticas de lasers para monitorizar e quantificar interações entre biomoléculas depositadas em diversas superfícies especialmente desenvolvidas. Os biossensores ópticos possuem propriedades importantes e são extremamente utilizados na detecção de antígeno/anticorpo através de biochips desenhados para tal (VO-DINH, 1998). Uma das primeiras aplicações de nanofibras ópticas nos biossensores envolvia um nanobiossensor cujo biorreceptor consistia em um anticorpo.

Em um nanossensor a laser, a luz é dirigida para a fibra e o campo eletromagnético gerado na ponta da fibra é usado para excitar as moléculas-alvo ligadas a anticorpos (biorreceptores). Um sistema de detecção fotométrica (detecção de luz) é utilizado para detectar o sinal óptico (por exemplo, fluorescência) originado pelas moléculas do analito ou pela reação entre o analito e o biorreceptor (HERRON *et al.*, 2005; MCDONAGH *et al.* 2009).

Desde o desenvolvimento deste primeiro nanobiossensor óptico, esta tecnologia tem sido aplicada à detecção de vários metabolitos como o óxido nítrico e o glutamato, assim como para a determinação de mecanismos de transporte de vários compostos, além de testes sorológicos. Os sensores a laser podem ser usados *in vivo*, na análise de proteínas e biomarcadores em células vivas individuais (HERRON *et al.*, 2006).

### 2.2.2. Nanobiochips: *lab-on-a-chip*

Talvez a mais notável tendência em pesquisa sobre biossensores ao longo das últimas décadas tenha sido a aplicação da nanotecnologia para a construção de biossensores. Além de algumas vantagens de desempenho analítico, a nanotecnologia traz para os

biossensores a possibilidade da construção de matrizes capazes de mensurar analitos de maneira paralela, simultânea e com alto rendimento, além da capacidade de integração de biossensores com sistemas de microflúidos, o que levou à construção de dispositivos *lab-on-a-chip* (D'ORAZIO, 2001).

Uma classe especial de nanobiossensores são os nanobiochips, que contêm múltiplos elementos transdutores e se baseiam em circuitos integrados (VO-DINH *et al.*, 2000, 2001). Um biochip, de um modo geral, define-se como um dispositivo que tem uma matriz em forma de microarranjos de biorreceptores, denominados sondas, imobilizados em uma superfície. A matriz é uma coleção de locais de análise miniaturizados, arranjados de forma a permitir a realização de testes em simultâneo ou em paralelo.

A tecnologia *lab-on-a-chip* concilia conhecimentos de diferentes áreas: micro/nanofabricação, análise química, microfluídica e bioinformática, constituindo um novo paradigma para os sistemas de análises clínicas. Um dispositivo deste tipo integra diversas análises laboratoriais em um único chip de dimensões muito reduzidas.

Estes dispositivos analisam processos bioquímicos em massa, detectando diversos analitos em uma só amostra. A maioria destes dispositivos é fabricada através de processos de moldagem ou fotolitografia, desenvolvidos na indústria eletrônica para criar circuitos de compartimentos (onde vão ser imobilizadas as sondas) e canais, usando materiais compostos como a quartzo, sílica ou vidro (LIN *et al.*, 2010).

### **2.3. Desenvolvimento dos biossensores**

Um dos primeiros sensores portáteis era o do eletrodo do pH do vidro, inventado em 1922 por Hughes (HUGHES, 1922). Contudo, passaram-se quase trinta anos para que o primeiro biossensor verdadeiro, isto é, um sensor que utiliza moléculas biológicas, surgisse. Em 1956, Leland Clark publicou um artigo sobre eletrodo capaz de detectar oxigênio (CLARK, 1956). Este dispositivo transformou-se na base para um sensor de glicose desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons (CLARK, 1956).

Contudo, os rápidos avanços tecnológicos da bioquímica e dos campos do semicondutor nos anos 80 e do alreta ao bioterrorismo e consequente pressão da indústria crescente da biotecnologia, conduziram ao desenvolvimento dos biochips na década de 90, que permitem a análise de uma grande quantidade de alterações genéticas ou presença de patógenos ao mesmo tempo, necessitando de pouco material (FORTINA *et al.*, 2001). O tempo necessário para a execução da técnica é outra grande vantagem, além da

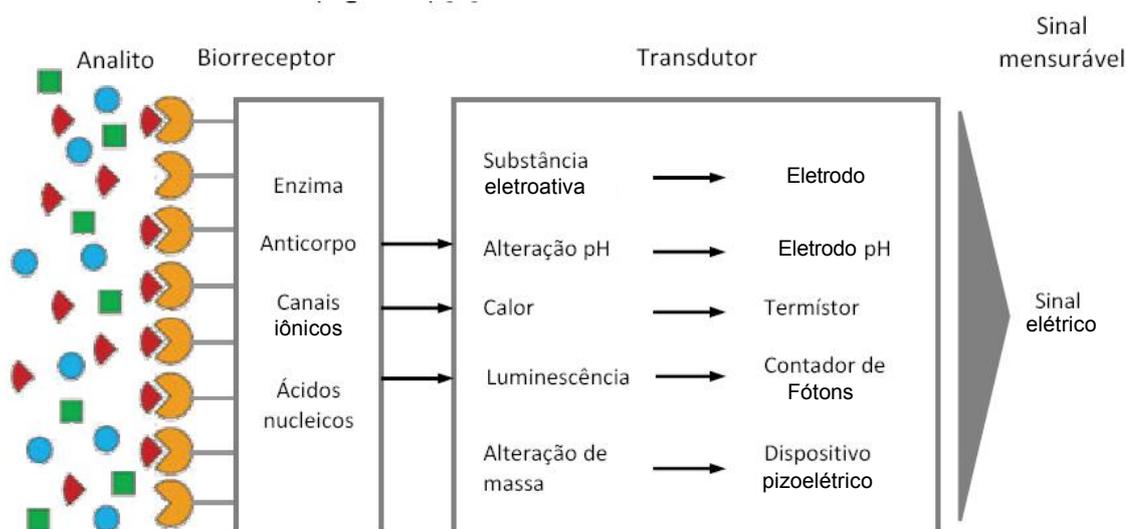
possibilidade de automação, que permite a realização de exames em larga escala sem prejuízo da fidelidade, contribuindo para o barateamento do custo.

### 2.3.1. Classificação dos biossensores

Os organismos biológicos possuem alta capacidade de reconhecimento de substâncias estranhas (ABBAS *et al.*, 2008). Usando-se biorreceptores a partir de organismos biológicos ou receptores que tenham sido modelados após sistemas biológicos, os cientistas desenvolveram um novo meio de análises químicas que muitas vezes têm alta seletividade dos sistemas de reconhecimento biológico. Estes elementos de biorreconhecimento, em combinação com diversos métodos de transdução, têm ajudado a criar e expandir-se rapidamente o campo da bioanálise e da tecnologias afins, conhecidas como biossensores e biochips (FRENESIUS, 2000).

Um biossensor pode ser geralmente definido como um dispositivo que consiste em um sistema de reconhecimento biológico, muitas vezes chamado de biorreceptor, e um transdutor. A interação do analito com o biorreceptor é projetado para produzir um efeito que é medido pelo transdutor, que converte as informações em um efeito mensurável, como um sinal elétrico.

Os biossensores e biochips podem ser classificados, quer por seu biorreceptor ou pelo seu tipo de transdutor (Figura 1). O biorreceptor é uma espécie de molécula biológica: proteína (por exemplo: enzimas, anticorpos ou antígenos), ácidos nucleicos, DNA ou RNA,



**Figura 1.** Esquema geral de funcionamento de um nanobiossensor. Os biorreceptores reconhecem e ligam-se aos analitos. A interação entre o analito alvo e o biorreceptor é concebida de forma a produzir uma perturbação bioquímica no nanobiossensor (ex: alteração pH) – transdução, que pode em seguida ser convertida num efeito detectável e mensurável, como um sinal elétrico.

Fonte: JAIN, 2005.

estruturas proteicas como canais iônicos (JAIN, 2005; SHI, 2007) ou um sistema biológico (por exemplo, células, tecidos ou organismos inteiros) que utilizam mecanismos bioquímicos de reconhecimento, ou seja, é o agente responsável pelo reconhecimento específico do analito. Assim, a interação do biorreceptor com o analito leva a uma resposta ou reação fisiológica (por exemplo, calor transferido ou absorvido pela reação fisiológica; mudanças na distribuição de cargas, produzindo-se um potencial elétrico; movimento de elétrons, produzindo uma reação redox; emissão de luz durante a reação fisiológica ou uma diferença entre a absorvância de luz entre reagentes e produtos; efeitos de massa dos reagentes ou produtos; entre outros) (HERRON *et al.*, 2005).

Atualmente, existe uma variedade enorme de biossensores, consoante ao tipo de analito, que melhor se adapta ao reconhecimento pelo biorreceptor e transdutor. O componente da amostra de um biossensor contém uma camada biossensitiva. Essa camada pode conter biorreceptores ou ser feita de biorreceptores covalentemente ligados ao transdutor.

Tipicamente, os biossensores são compostos de três componentes: (1) o detector, que identifica o estímulo, (2) o transdutor, que converte este estímulo a um sinal, e (3) o sistema de produção, que envolve amplificação e exibição do sinal em um formato apropriado (leitor) (KENNETH, 2010)

Para se classificar devidamente um biossensor, em realidade, deve-se conhecer o biorreceptor que se vai utilizar, pois eles são a chave para a especificidade das tecnologias do biossensor. Eles são responsáveis pela ligação do analito de interesse para o sensor que irá quantificá-lo ou qualificá-lo. Estes biorreceptores podem assumir muitas formas e os diferentes biorreceptores usados nas pesquisas até hoje são tão numerosos quanto os diferentes analitos a serem monitorados. No entanto, geralmente, os biossensores podem ser classificados em cinco diferentes categorias principais. Essas categorias incluem: 1) interações antígeno/anticorpos, 2) interações de ácidos nucleicos, 3) interações enzimáticas, 4) interações celulares (microorganismos, proteínas) e 5) interações usando-se materiais biomiméticos (ou seja, biorreceptores sintéticos) (SAMPIETRO, 2011).

#### 2.3.1.1. Antígeno/anticorpo

Anticorpos são moléculas biológicas glicoproteicas, produzidas pelos linfócitos B, que apresentam muitas vezes um alto grau de especificidade e afinidade, ligando-se a a estruturas também muito específicas (ABBAS *et al.*, 2008). Isto é muito importante devido à natureza complexa da maioria dos sistemas biológicos (VAN BINSBERGEN, 1999;

LOCHHEAD, 2008). Um anticorpo é uma complexa biomolécula, composta de centenas de aminoácidos individuais dispostos em uma sequência altamente ordenada. Para uma resposta imunológica ser produzida contra uma molécula particular, um determinado tamanho e complexidade são necessários, ou seja, a maneira pela qual um antígeno e o anticorpo interagem pode ser entendido como análogo para um ajuste entre uma chave e sua fechadura. Da mesma forma, um anticorpo antígeno específico “encaixa-se” no seu único antígeno de uma maneira altamente específica. Esta propriedade única de anticorpos é a chave para a sua utilidade em imunossensores, onde apenas o analito específico de interesse se encaixa no local de ligação do anticorpo (VAN BINSBERGEN, 1999; LOCHHEAD, 2008).

Contudo, biossensores que utilizam esta especificidade deve garantir que a ligação ocorra em condições onde interações inespecíficas sejam minimizadas (KUBIK, 2005). A ligação pode ser detectada tanto através da marcação fluorescente ou observando um índice de refração ou mudança de refletividade (MONK, 2004).

Desde o primeiro desenvolvimento de um imunossensor remoto de fibra óptica para detecção *in situ* de um carcinógeno químico, os anticorpos têm se tornado biorreceptores comuns utilizados em biossensores nos dias de hoje (LOCHHEAD, 2008). Geralmente, os biossensores com biorreceptores antígeno/anticorpo tomam como base o método de ELISA para a construção de todo o sistema.

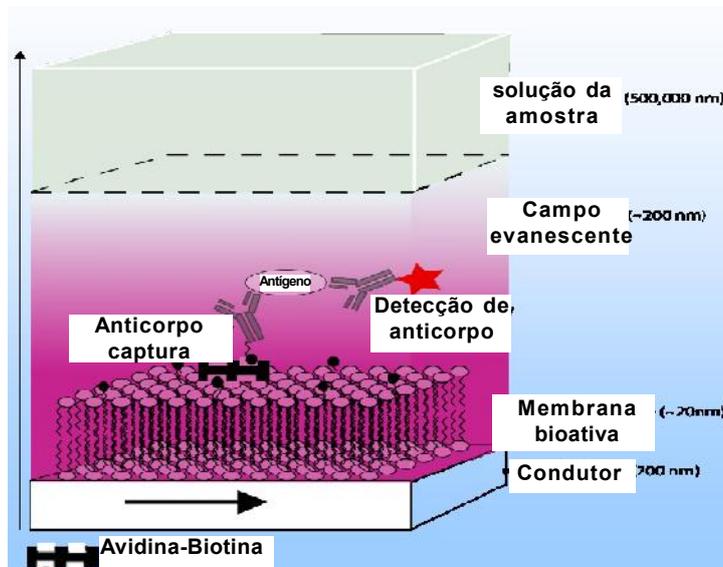
É relevante ressaltar que neste tipo de biossensores as interações biomoleculares são fundamentais para o sucesso do mesmo. Elas podem ser classificadas em duas categorias, de acordo com o formato do teste realizado (ou seja, direto e indireto).

No formato direto, a molécula-alvo imobilizada interage com uma molécula ligante ou o ligante imobilizado interage com uma molécula-alvo diretamente. Para imunossensores, a situação mais simples envolve a incubação *in situ* seguida por medição direta de um analito naturalmente fluorescente (HERRON *et al.*, 2005, 2006). Para sistemas de analitos não fluorescentes, a incubação *in situ* é seguida pelo desenvolvimento de um fluoróforo de acordo com o anticorpo. O resultado é que o anticorpo “sanduíche” marcado com o fluoróforo produz um sinal de fluorescência, que é diretamente proporcional à quantidade de antígeno ligado a ele (Figura 2). A sensibilidade obtida ao usar essas técnicas aumenta com o aumento da quantidade de receptores imobilizados.

Já o formato indireto envolve competição entre o antígeno marcado com o fluoróforo daquele não marcado (HERRON *et al.*, 2005, 2006). Neste caso, o analito não marcado compete com o analito marcado por um número limitado de sítios de ligação. A

sensibilidade do ensaio, portanto, aumenta com a diminuição da quantidade do reagente imobilizado.

Devido às diferenças entre as fibras ópticas, há, por vezes, uma grande dificuldade em normalizar o sinal de uma fibra com o sinal de outra fibra nos biossensores. Por esta razão, a utilização de métodos diretos são mais eficazes e utilizados (HERON, 2005, 2006; D'ORAZIO, 2011).

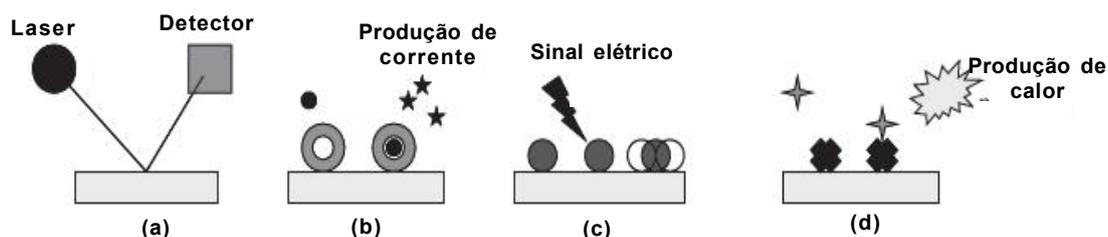


**Figura 2.** Exemplo de um biossensor baseado no ensaio “sanduíche”, tomando por base o ELISA. Fonte: GRACE, 2011.

Inserido neste contexto encontram-se os imunossensores. Imunossensores são sistemas de análise baseados em princípios de imun química que podem automaticamente realizar análises variadas e a um só tempo. São instrumentos pequenos, portáteis, que são utilizados para análise de fluidos complexos e multianálitos, projetados pela a facilidade de uso, sem necessidade de profissional treinado, com ensaio rápido e sensibilidade comparável à do ELISA. Durante a última década, uma série de métodos para imunensaio por interações específicas entre antígenos e anticorpos para analisar microorganismos, vírus, pesticidas e poluentes industriais foram desenvolvidos (YULDEV, 2001; BLONDER, 1997; COHEN, 1997; BARNETT, 1997).

### 2.3.2. Tipos de transdutores

Os biossensores também podem ser classificados com base nos métodos de transdução que empregam. A transdução pode ser realizada através de uma grande variedade de



**Figura 3.** Tipos de transdutores mais usados: (a) ópticos; (b) eletroquímicos; (c) medidas de massa sensíveis; (d) térmicos.

Fonte: adaptado de KENNETH, 2010.

métodos. 1) medidas ópticas (ou seja, fluorescência, luminescência, absorção, ressonância, etc.); 2) eletroquímica; 3) medidas de massa sensíveis (ou seja, ondas acústicas de superfície, microbalança, etc.); e 4) detecção térmica (KENNETH, 2010) (Figura 3).

No entanto, novos tipos de transdutores estão sendo constantemente desenvolvidos para uso em biossensores. Cada uma destas quatro classes principais contém diferentes subclasses, criando um número quase infinito de possíveis métodos de transdução ou combinação de métodos.

### 2.3.2.1. Detecção óptica

A transdução óptica oferece o maior número de possíveis subcategorias de todas as quatro classes de transdutores, bem como são os mais utilizados. Isto é devido ao fato de que os biossensores ópticos podem ser usados para tipos diferentes de espectroscopia (por exemplo, absorção, fluorescência, fosforescência, Raman, SERS (do inglês, *surface enhanced raman spectroscopy* ou *surface enhanced raman scattering*), refração, espectrometria de dispersão, etc. (MAYES *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 1999; RUSSELL *et al.*, 1999; DESIKAN *et al.*, 1999; PRINGSHEIM *et al.*, 1999; DISLEY *et al.*, 1999; HOMOLA *et al.*, 1999; NEWMAN *et al.*, 1999; LIU XI *et al.*, 1999; O'CONNELL *et al.*, 1999; LI *et al.*, 1999) com diferentes propriedades espectroquímicas. Estas propriedades incluem: amplitude, energia, polarização, entre outras propriedades.

Em termos de biossensores de arranjos, as alterações de fluorescência e de índice refrativo usando transdução de refletância são os métodos mais utilizados. Nas dosagens por TIR (do inglês, *total internal reflection*) ou TIRF (do inglês, *total internal reflection fluorescence* - fluorescência por reflexão interna total), a onda evanescente interage com o fluoróforo e o excita perto da superfície do condutor de onda, e a fluorescência resultante é medida pelo detector (LU *et al.*, 1992; CHITTUR, 1998; PLOWMAN *et al.*, 1998; WADKINS *et al.*, 1998) (ver item 2.5). A maioria dos sistemas finais descritos consiste de vários componentes similares, tais como a fonte de luz, o detector e uma variedade de lentes de focalização para melhorar a resposta do detector (DUVENECK *et al.* 1995; HERRON *et al.* 1996, 1997; GOLDEN, 1998; FELDSTEIN *et al.* 1999).

A fluorescência por reflexão interna total (TIRF) é um processo no qual fluoróforos que são fixos, ou estão muito próximos à superfície do condutor de onda, são seletivamente excitados via uma onda evanescente. Os condutores de onda evanescentes fornecem uma possibilidade de imobilizar múltiplas biomoléculas de captura sobre uma única

superfície e, assim, oferecem a perspectiva de detecção de múltiplos analitos. Muitos desenvolvimentos levaram a um biossensor de arranjos de TIRF, que é automatizado para monitoramento ambiental, clínico e de alimentos ou para detecção de agentes de bioterrorismo (SAPSFORD *et al.*, 2004a; 2004b).

A luz na forma de laser é tipicamente usada como a fonte de excitação nos estudos de TIRF. A escolha exata do laser é dependente do marcador fluorescente usado. Os lasers mais comumente usados incluem o laser de íon de argônio (488 nm) para o marcador de fluoresceína; o de hélio-neônio (633 nm) ou laser diodo (635 nm) para o corante de cianina (Cy5); e marcadores Alexa Flúor. A luz do laser é tipicamente acoplada no condutor de onda usando-se ou técnicas de lentes ou de retículas (SAPSFORD *et al.*, 2004b).

Um efeito de condutores de onda volumosos do elemento de reflexão interna (ERI) e luz colimada é a produção de “pontos quentes”, sensores ao longo da superfície planar. Estes ocorrem onde o feixe de luz é refletido, iluminando somente regiões discretas da superfície de leitura do condutor de onda (SAPSFORD *et al.*, 2004b).

Golden (1998) usou uma lente de índice gradual bidimensional para focalizar a fluorescência do condutor de onda planar sobre um dispositivo acoplado de carga (câmara CCD - do inglês, *charge coupled device*), provendo uma distância mais curta de trabalho do que uma lente padrão, com uma diminuição concomitante no tamanho global do instrumento.

#### **2.4. A biomolécula para o reconhecimento molecular**

Como já referido no item 2.3.1., a escolha da biomolécula utilizada no desenvolvimento de um biossensor de microarranjo é muito dependente da disponibilidade da molécula de bio-reconhecimento para o analito de interesse e a aplicação requerida (IQBAL *et al.*, 2000). Até hoje, interações entre anticorpo e antígeno, hibridização de ácido nucléico (DNA/RNA) e, em uma menor proporção, ligação receptor-ligante, têm sido monitoradas via TIRF. Embora estas biomoléculas caracteristicamente contenham fluorescência intrínseca, na forma de resíduos de aminoácidos ou cofatores, marcadores fluorescentes extrínsecos que preferencialmente excitam em um comprimento de onda diferente são normalmente introduzidos em uma das partes ligantes. Estes marcadores extrínsecos de fluorescência tomam a forma de corantes, tais como rodamina, cumarina, cianina, ou fluoresceína, e permitem o uso, através de seleção espectral, de fontes de excitação de comprimento de onda visível, tais como os diodos de laser (SAPSFORD *et al.*, 2004b).

Interações anticorpo-antígeno são os sistemas mais bem caracterizados empregados em sensores à base de TIRF. Os ensaios são realizados usando-se sistemas anticorpo-antígeno e podem ser divididos em quatro categorias principais: ensaios diretos, indiretos, competitivos, de deslocamento e sanduíches (RABBANY *et al.*, 1994). O ensaio indireto é o método mais simples de realizar; no entanto, requer que o antígeno contenha alguma forma de fluorescência intrínseca que possa ser detectada. Na ausência de antígeno fluorescente, os formatos preferidos são os dos ensaios competitivos e sanduíches.

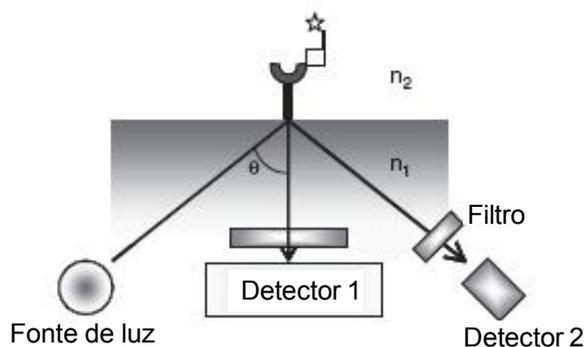
#### 2.4.1. Imobilização da biomolécula no condutor de onda

Um importante pré-requisito para todas as técnicas de imobilização é que a integridade da biomolécula seja preservada e que um sítio ativo permaneça acessível à parte ligante. Existem vários métodos em que o componente biológico de um sistema biossensor pode ser imobilizado na superfície de um transdutor, incluindo adsorção física, imobilização covalente e enredamento em matrizes poliméricas (HALL, 1990). A adsorção física e a ligação covalente para superfícies funcionais são os métodos mais usados em medidas de TIRF.

### **2.5. Biochips: sistemas ópticos e fluídicos em circuito integrado**

Este sistema baseia-se em condutores de ondas planares ópticas que são usados para direcionar a excitação da luz para fluoróforos que são direcionados (em um formato de imunoensaio - ELISA) para a superfície de condutores de onda. Muitos fatores precisam ser ponderados e equilibrados na seleção dos condutores de ondas, porque, a depender do tipo de condutor empregado, é que se determina o desenvolvimento dos sistemas ópticos e fluídicos associados (LOCHHEAD, 2008).

A fim de se compreender o desenvolvimento de um sistema de biochip com base no sistema óptico e fluídico em circuito integrado, é necessário entender brevemente os princípios ópticos dos condutores de onda. A excitação da luz que se move em um condutor de onda óptico é restrito por TIR ou TIRF, permitindo a junção de lasers através de fibra óptica, sendo a ferramenta ideal para rápida observação dos processos da membrana - mesmo quando os sinais são muito fracos e os tempos de exposição são extremamente curtos. Contudo, todo este processo é limitado por uma série de condições, como o comprimento de onda, ângulo de incidência e de índices de refração relacionados ao condutor de onda e o meio circundante (Figura 4) (AXELROD, 1984). O meio circundante, referido como o revestimento deve ter um menor índice de refração do que o condutor de onda no intuito de atingir a TIR.

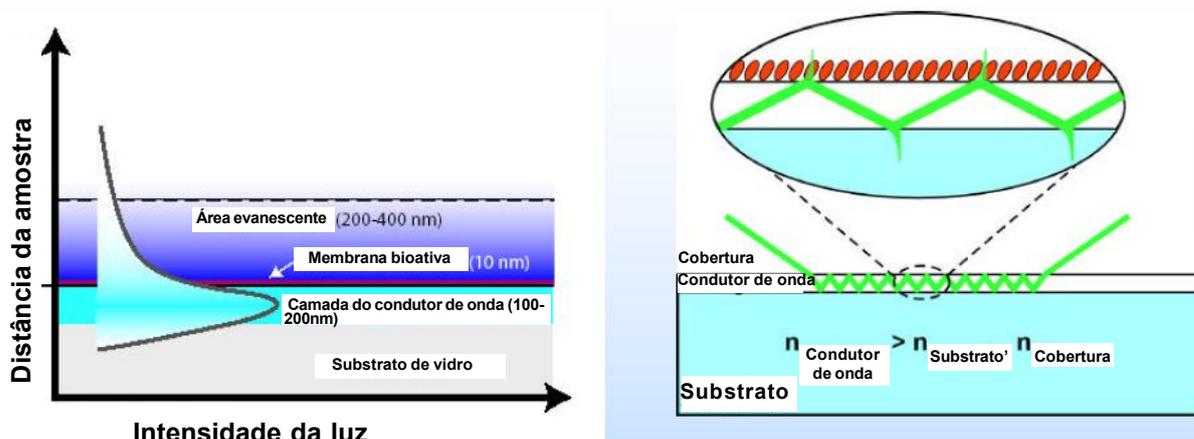


**Figura 4.** A organização experimental básica de um sistema baseado no princípio de fluorescência de reflexão interna total (TIRF).

Fonte: Adaptado de Sapsford *et al.* (2004b).

Assim, há uma inerente conflito entre manter da luz pela TIR e maximizar o campo evanescente quando um revestimento é usado por condutores de onda. Como sugerido anteriormente, este conflito torna-se problemático quando o condutor de onda será utilizado não só para conntinuar e transmitir a luz, mas também para operar uma fonte de excitação evanescente ou um sensor em um ambiente de baixos índices, como o ar ou a água. Uma vez que não existem materiais de revestimento com índices de refração na faixa entre o ar e a água, não é possível nem maximizar o campo evanescente no ar ou na água e assim “confinar” a luz por TIR.

Este conflito pode ser resolvido desenvolvendo-se um sensor em torno de um condutor de onda cônico ou um mono-modo condutor de onda projetado para um melhor equilíbrio entre o confinamento óptico e a profundidade de penetração do campo evanescente (ANDERSON, 1993a, 1993b; GOLDEN, 2005). No entanto, é preferível, por uma série de razões, basear o sensor em um multimodo de condutores de onda (como condutores planares - Figura 5). Em primeiro lugar, o multimodo pode ser muito simples e barato.



**Figura 5.** Sistema de condutores de onda planar.

Fonte: GRACE, 2011.

Por exemplo, condutores de onda planares utilizadas no sistema atual são lâminas de microscópio de qualidade comercial. Por outro lado, mono-modo de condutores de onda são tipicamente formados por um método preciso de deposição. Uma segunda vantagem relativa de um multimodo de condutores de onda é que a luz de acoplamento para o condutor é trivial em comparação com um condutor de onda mono-modo. Tudo o que é necessário para acoplar a luz ao condutor de onda é dirigir o feixe de luz para faixa terminal do suporte (lâmina) em determinado ângulo dentro da abertura numérica do condutor de onda. Sob essas condições, uma vez que a luz que entra no condutor de onda, será confinada e guiada pela TIR. Além disso, dada a relativa extensa face de um condutor de onda multimodo, o posicionamento do feixe na face final da lâmina pode variar significativamente e ainda ser suficientemente acoplada ao condutor de onda, o que não é possível com um condutor de onda mono-modo. Assim, para um sistema de sensores que se destina a ser robusto e portátil, a utilização de condutores de onda multimodos são mais seguros e baratos. A superfície bidimensional do condutor de onda confere a si própria elementos de padronização espacial de arranjos multianálise e análise de imagem utilizando apenas uma única fonte de excitação de comprimento de onda e um fluoróforo. Esta abordagem é inerentemente mais flexível e menos complicada do que tentar resolver múltiplos comprimentos de onda de diferente fluoróforos dentro de um único elemento, tanto em termos do número de análises que podem ser medidos simultaneamente e quanto pela exigência complexa da óptica. Para este efeito, os métodos para a formação de padrões espaciais e os elementos sensores para medir sinais de um grande número de elementos têm sido desenvolvidos (KENNETH, 2010).

O problema de anexar um fluxo de célula a um condutor de onda sem perturbar o confinamento da excitação da luz, mas ainda assim permita a otimização do campo evanescente é uma questão que deve ser resolvida. Para este fim, um único padrão de revestimento reflectivo foi desenvolvido para isolar o condutor de ondas opticamente a partir do fluxo de células. Os sistemas de suporte óptico para a excitação do condutor de onda incluem um meio de alcançar uniformemente esta excitação no condutor e um sistema de imagem compacto baseado em dispositivo CCD (do inglês, *charge-coupled device* - dispositivo de carga acoplada - sensor para captação de imagens formado por um circuito integrado que contém uma matriz de capacitores acoplados) (KENNETH, 2010).

Desta forma, um completo sistema óptico e fluídico integrado tornou possível a realização de ensaios fluorescentes com uma variedade de moléculas utilizando um baixo custo e multimodo de condutores de onda.

Assim, os biossensores baseados em multiarranjos para detecção de multianalitos em sistemas ópticos (condutores de onda planares) fluídicos baseados em circuitos integrados e ligados a processadores digitais (sistemas baseados em câmeras digitais - CCD - e materiais de computadores comumente utilizados) tem demonstrado as seguintes capacidades: 1) analisar simultaneamente amostras para vírus, bactérias, DNA e toxinas, 2) usar limites de detecção extremamente baixos como 107 PFU / ml (MS2), 105 ufc / mL (BG), e 10 ng / mL (SEB), e 3) analisar uma diversidade de amostras - sangue total, plasma, saliva, swab nasal (ROWE *et al.*, 1998, 1999, 2000).

O design compacto deste biossensor torna-o especialmente indicado como “laboratórios portáteis”. Além disso, o sistema fluídico automático torna o ensaio torna possível para executar pelo menos seis amostras independentes simultaneamente, uma tarefa que seria difícil de se alcançar manualmente. Finalmente, em conjunto com um software de análise automatizada de dados, o sistema é passível para utilização por um operador não treinado tecnicamente.

## **2.6. Desenvolvimento dos leitores de biochips/biossensores (*Biochip Reader*)**

### **2.6.1. Naval Research Laboratory (NRL)**

O *Multi-Analyte Array Biosensor* (MAAB/Biossensor de múltiplos analitos em arranjo) foi desenvolvido pelo Naval Research Laboratory (NRL) com o intuito de detectar e identificar múltiplos analitos simultaneamente (TAITT *et al.*, 2004). O *Biochip Reader* (Leitor/Biossensor) é um instrumento eletrônico desenvolvido com o objetivo de aplicá-lo na detecção de nanogramas de toxinas, alergênicos, proteínas, bactérias, parasitas ou anticorpos e antígenos, utilizando uma quantidade mínima de material biológico, sem necessidade de processamentos específicos (BAKALTCHEVA *et al.*, 1998, 1999). Este biossensor é um aparelho no qual sistemas de reconhecimentos biológicos (enzimas, anticorpos), são acoplados a microeletrônicos para tornar possível a detecção de baixos níveis de substâncias como açúcares e proteínas em fluídos corpóreos, poluentes em água e gases no ar. O *Biochip Reader* pode analisar material contendo sangue total, esputo, urina ou outros materiais orgânicos utilizados no sistema do diagnóstico clínico laboratorial. Uma característica fundamental deste sistema é sua configuração bidimensional, que permite que os controles e os padrões sejam analisados em paralelo com as amostras desconhecidas.

O biossensor do NRL foi projetado utilizando-se o sistema de microarranjos e foi desenhado para ser usado com um laptop para o controle dos fluidos, análise e

armazenamento dos dados (LIGLER *et al.*, 2007). Devido à sua seletividade e sensibilidade, os imunoenaios constituíram a primeira escolha para o desenvolvimento de métodos rápidos de identificação usando o biossensor de arranjo do NRL, baseado em fluorescência (TAITT *et al.*, 2004).

O *Biochip Reader* pode ser operado em qualquer ambiente e não necessita de nenhum conhecimento específico de técnicas laboratoriais. Trata-se de um sistema óptico a laser, portátil, capaz de processar automaticamente até 20 testes diferentes em uma única fase de execução com duração de 15 minutos (TAITT *et al.*, 2004; LIGLER *et al.*, 2007).

### **2.7. Aplicações dos biochips no diagnóstico clínico do HIV**

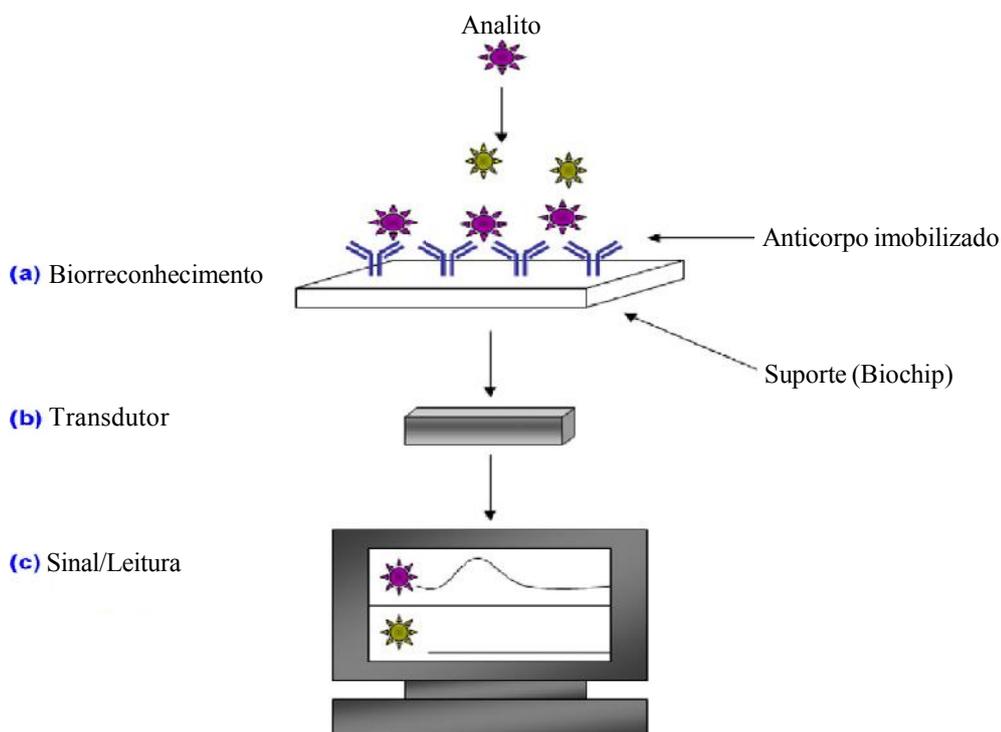
Existem inúmeras aplicações para as tecnologias dos biossensores e biochips nos cuidados em saúde e para o manejo do tratamento de doenças infecciosas (LIMA *et al.*, 2002). Os biossensores e biochips oferecem a promessa para o diagnóstico de campo de doenças infecciosas em tempo real e a possibilidade de intervenção precoce e contenção das doenças (PEJCIC, 2006; GOULART *et al.*, 2010). A implantação de analisadores portáteis ou de “pronto-atendimento” (POC, do inglês, *point-of-care*), com base em biossensores, podem ser extremamente úteis para regiões remotas, carentes de cuidados em saúde e para países em desenvolvimento, onde o acesso com apoio laboratorial é limitado.

Em relação ao HIV, estudos também têm se mostrado eficientes com relação aos biossensores e biochips. Tradicionalmente, as infecções pelo HIV são diagnosticadas tanto por ensaios de fluorescência direta de anticorpo ou por carga viral (CHA *et al.*, 2011). Contudo, estes tipos de teste diagnóstico, apesar de sensíveis e confiáveis, necessitam de laboratórios, pessoal treinado e o custo é elevado. A aplicação de biossensores e biochips baseados nas técnicas ópticas pode aumentar consideravelmente a compreensão dos mecanismos de detecção e quantificação do HIV em relação aos testes já existentes (LOCHHEAD, 2008).

### 3. Precision Photonics Corporation

A Precision Photonic Corporation (PPC), EUA, propôs um programa de investigação e desenvolvimento dirigido a uma tecnologia de baixo custo para o diagnóstico de HIV e AIDS e suas coinfeções mais comuns. Devido à natureza global da doença e os produtos para diagnóstico existentes no mercado, foi necessário qualificar o instrumento de desenvolvimento fora dos Estados Unidos para avaliar o desempenho em uma população com doenças diferentes. Assim, a PPC, juntamente com a divisão corporativa mBio diagnóstico, adaptou o biossensor de arranjos do NRL e desenvolveu, com sucesso, protótipos de um instrumento de baixo custo de diagnóstico para doenças infecciosas, inicialmente HIV e suas coinfeções mais comuns, além de outras infecções, tais como: tuberculose, HCV, HBV, sífilis, leishmania, citomegalovírus e toxoplasmose. O equipamento baseia-se em 3 conjuntos: o Biochip, que se refere ao cartucho/lâmina de teste de consumo (descartável) - que contém o analito para reconhecimento - o transdutor e o leitor *Biochip Reader* (não descartável), equipamento de leitura (não descartável) (Figura 6).

Com o sucesso deste projeto inicialmente realizado nos EUA, a PPC integrou diversas instituições ao redor do mundo para a validação desses biossensores em locais



**Figura 6.** Modelo esquemático do *Biochip Reader*.

Fonte: Adaptado de CONROY, 2009

diferentes, principalmente em países em desenvolvimento, a fim de observar se os testes teriam a mesma sensibilidade e especificidade dos resultados obtidos na Fase 1, ocorrida nos EUA.

Para este fim, a PPC estabeleceu uma parceria com a Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Laboratório de Doenças Tropicais, para que o conjunto de dados gerados aqui no Brasil possam ser usados diretamente no desenvolvimento do produto final da PPC.

Nesta tese apresentamos os resultados da Fase 2 do projeto, com resultados importantes e promissores na validação dos biossensores para HIV e a coinfeção pelo HCV em colaboração entre intuições brasileiras e americanas: a Universidade Federal da Bahia (UFBA), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), a companhia de bioengenharia dos Estados Unidos, a Precision Photonics Corporation, a mBIO Diagnostic Inc. e a Divisão de Doenças Infecciosas da Universidade de San Diego (UCSD), Califórnia, EUA.

### **3.1 Desenvolvimento do biossensor pela PPC**

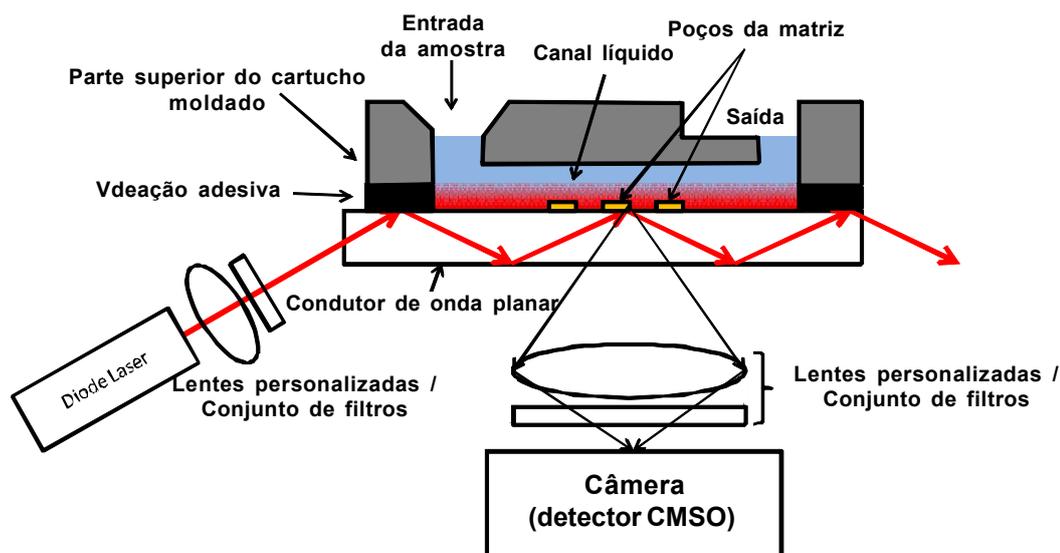
#### **3.1.1. A plataforma de diagnóstico de baixo custo**

A tecnologia proposta pela PPC para a criação da plataforma do *Biochip Reader* é amplamente utilizada para o diagnóstico molecular. Além de sorologia, fluorescência de reflexão interna total (TIRF), os sensores têm se mostrado eficazes em medições quantitativas de antígenos e anticorpos circulantes (LOCHHEAD, 2008). Neste sentido, o biossensor baseia-se em uma plataforma multiplex avançada, com circuito integrado para análise de multianálitos, sistema óptico com detecção a laser e condutores de onda planar, baseada em fluorescência, que tem como base os imunoenaios de ELISA com extraordinária sensibilidade, confiabilidade e baixo custo para doenças infecciosas, em especial HIV e suas coinfeções (Figura 7).

#### **3.1.2. Do protótipo baseado do NRL ao sistema corrente**

Do protótipo inicial do *Biochip Reader*, baseado nos biossensores do NRL ao instrumento hoje utilizado pela PPC, progressos significativos foram realizados para o aprimoramento da plataforma.

Basicamente, o leitor PPC do biochip é um sistema de detecção óptico a laser baseado em fluorescência. Um diodo a laser é usado enquanto a fonte clara e o detetor são



**Figura 7.** Representação esquemática de condutores de onda planar multimodo e o sistema de cartucho/lâmina.

Fonte: LOCHHEAD, 2008.

compreendidos por um tonalizador CMOS ou CCD. O equipamento consiste de um laptop, um biossensor (leitor) multipatógeno, capaz de detectar analitos de uma só vez, uma interface separada do biossensor a fim de que não ocorra contaminação quando da manipulação do leitor (Figura 8a - detalhamento Figura 9) e as 'lâminas' em formato de tiras em microarranjos, previamente sensibilizadas (Figura 8b). É um equipamento simples, portátil, fácil de operar, que requer preparação mínima da amostra e pouca habilidade em manuseá-lo, que consome pouca energia, sendo apropriado para utilização em áreas rurais e cidades com precárias condições sócio-econômicas. Com base neste contexto, o intuito de todo o projeto é adaptar a tecnologia de condutores de onda planares de baixo custo para a criação de diagnóstico clínico.

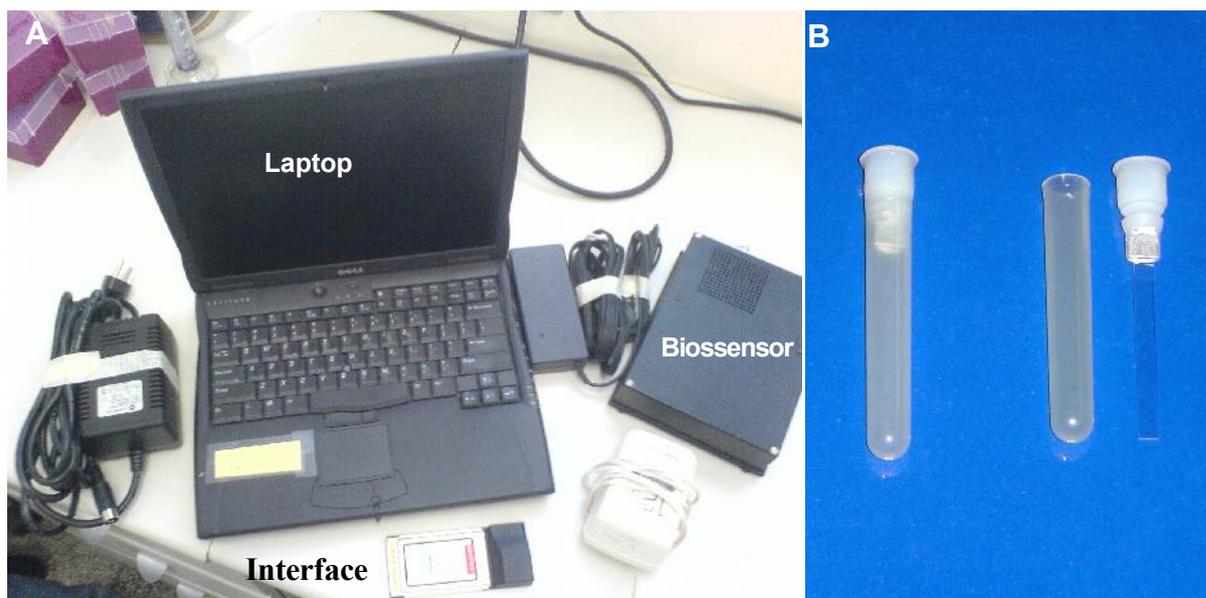
Todas as partes individualizadas deste protótipo foram oriundas da Precision Photonics Corporation (EUA). As características deste protótipo estão descritas na Tabela 2.

### 3.1.3. Método de preparação das unidades de biochips (cartões diagnósticos)

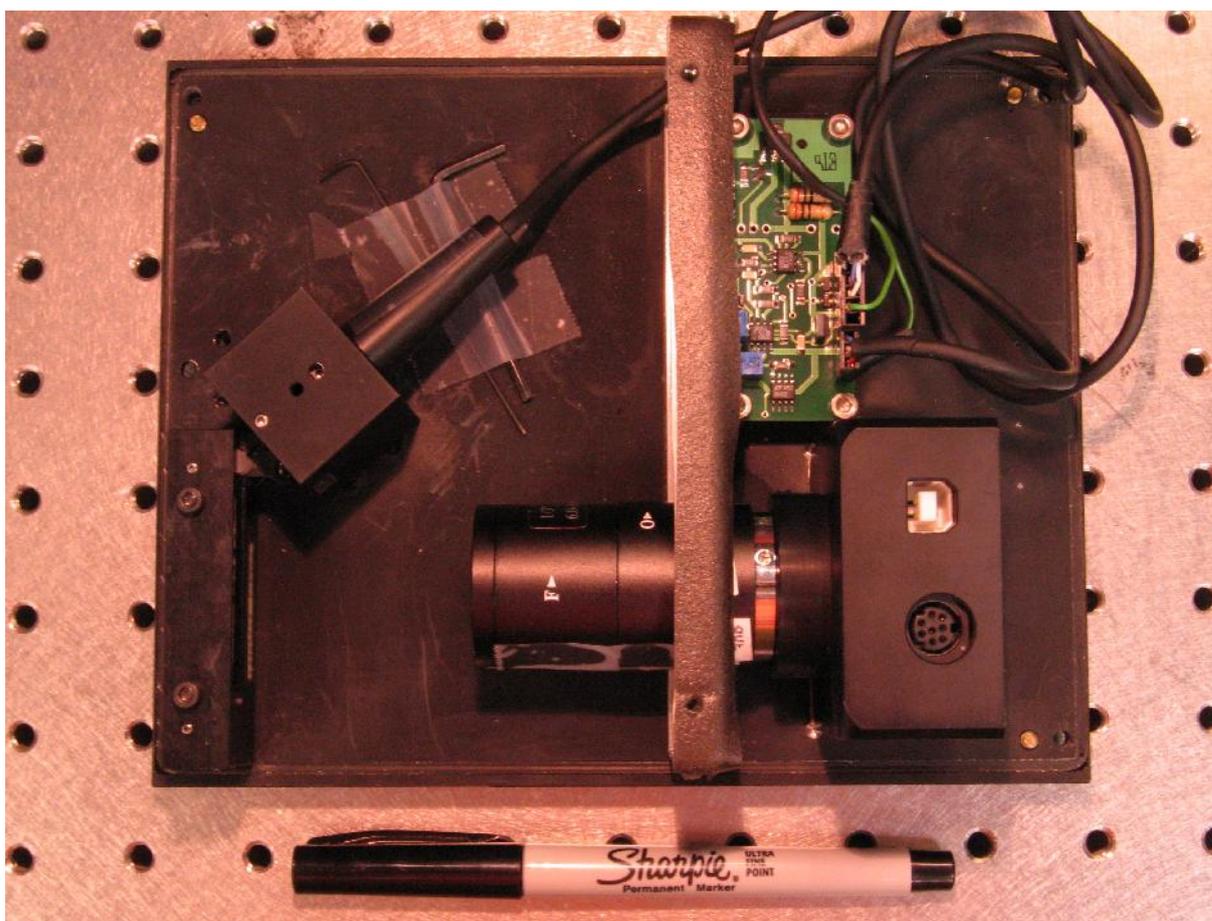
O biochip (cartões diagnósticos) é em formato de uma tira plástica miniaturizada, disposta em microarranjos, tendo sido sensibilizada com os antígenos para HIV e HCV; além da presença dos controles negativos e positivos. A preparação dessas tiras especificamente para os microorganismos-alvos ocorreu na Fase 1.

### 3.1.4. Preparação dos biochips e especificações

Na Precision Photonics Corporation (EUA), as amostras foram colocadas em recipientes fechados e foram bombeadas diretamente nos chips. Os chips, à semelhança de lâminas/



**Figura 8.** (a) *Biochip Reader* utilizado neste estudo piloto; (b) tiras em microarranjos (biochip) previamente sensibilizadas.



**Figura 9.** Detalhamento do biossensor.

tiras (Figura 8b), apresentaram áreas específicas contendo concentrações conhecidas de antígenos através de ligação imunoenzimática à semelhança da técnica de ELISA indireto em que o objetivo é dosar anticorpos específicos para um determinado antígeno.

**Tabela 2.** Critérios do leitor de diodo a laser que atende ao protótipo do biochip da PPC.

A	Acessibilidade	O Biochip pode diagnosticar entre 6-10 testes para o custo de um teste de HIV hoje sozinho
S	Sensibilidade	Dados iniciais indicam que os nossos testes tiveram > 95% de sensibilidade para HIV e um painel de coinfeções
S	Especificidade	Dados iniciais indicam que os nossos testes tiveram > 95% de especificidade para HIV e um painel de coinfeções
U	Utilização amigável	O <i>Biochip Reader</i> pode ser facilmente manipulado em qualquer lugar.
R	Rápido	O <i>Biochip Reader</i> pode ler resultados em até 20 minutos
E	Equipamento portátil	O <i>Biochip Reader</i> pode operar com a força de bateria e de baixo (com dispositivos peso. Ele não necessita de refrigeração e tem uma vida útil de 9 a 18 de bateria) meses
D	Fácil distribuição	O custo total do leitor e do biochip os tornam candidatos perfeitos para países em desenvolvimento e membros da Organização Mundial de Saúde para prover diagnóstico para HIV e suas coinfeções mais comuns a um baixo custo

Posteriormente, cada patógeno foi colocado em local específico, eletronicamente identificado,, onde o bombeamento da amostra foi direcionado (*Bio-dot-Arrayer*). Nessa fase de construção, curvas dose-respostas foram preparadas para cada patógeno a fim de se comparar aos resultados obtidos nos estudos-testes.

Misturas conhecidas da amostra contendo o alvo a ser identificado (anticorpos) foram testadas múltiplas vezes para padronização da sensibilidade e especificidade do biochip (LIGLER *et al.*,2007).

Esse mesmo sistema desenvolvido pela Precision Photonics Corporation foi utilizado no estudo piloto desta tese, que será detalhadamente descrito nas seção de Material e Métodos.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo principal

Este trabalho é um estudo piloto que tem como objetivo principal avaliar a operacionalidade do sistema de leitor de circuito integrado (*Biochip Reader*) da PPC/mBio Inc. no diagnóstico para detecção de anticorpos contra HIV e HCV no Brasil (Salvador, Bahia).

### 4.2. Objetivos específicos

1. Analisar a sensibilidade da nova tecnologia diagnóstica do biossensor-leitor (*Biochip Reader*) através dos resultados obtidos a partir das amostras coletadas de pacientes documentados com as doenças-alvo (HIV/HCV) em soros/plasma antigos e recentes.
2. Avaliar os dois protocolos produzidos e encaminhados pela Precision Photonics Corporation/mBio (EUA) e os resultados oriundos da execução dos mesmos.

## 5. Materiais e Métodos

Este estudo piloto, realizado no Laboratório de Doenças Tropicais do Complexo Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), ocorreu em dois momentos: março de 2008 e setembro de 2010, e fez parte da Fase 2 do projeto da PPC/mBio, Universidade de San Diego e Universidade Federal da Bahia.

Este estudo piloto consistiu na avaliação e aplicação do material encaminhado pela PPC/mBio (tiras/lâminas já previamente sensibilizadas e bloqueadas nos EUA, o *Biochip Reader* com os softwares *BCRanalysis* e o *runcamera.exe* instalados em um laptop, os protocolos de execução, seguidos da lista de materiais e dos procedimentos passo-a-passo a serem adotados na manipulação do biossensor) nas amostras (soros/plasma) fornecidas pelo HUPES, bem como materiais e reagentes.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) da UFBA em parecer de 20 de junho de 2006, sob o número 60/2006 e ainda em vigor.

### 5.1. Protocolo dos testes

Foram encaminhados dois protocolos pela PPC/mBio (Figuras 10 e 11) para os testes realizados na Bahia, com alterações em relação à disposição e aos antígenos utilizados impressos no biochip. O protocolo 1 (Figura 10) apresentou apenas os antígenos para o *core* do HCV e a proteína gp41 do envelope viral do HIV. No protocolo 2 (Figura 11), além dos antígenos referidos no protocolo anterior, foram inseridos os antígenos das proteínas gp120 do HIV, NS3 do HCV, diminuição de uma grade de *spots* tanto para o controle positivo quanto para o negativo, e um maior número de *spots* para o controle IgG humano. Além disto, foram aumentados os *spots* que continham o antígeno gp41 para HIV. Em relação aos reagentes e procedimentos adotados, os dois protocolos eram idênticos.

Os procedimentos do método empregado neste trabalho foi integralmente encaminhado pelos responsáveis pelo projeto nos Estados Unidos – Universidade de San Diego (UCSD) e Precision Photonics Corporation/mBio – cuja descrição encontra-se abaixo brevemente especificada.

#### 5.1.1. Protocolo PPC/mBio

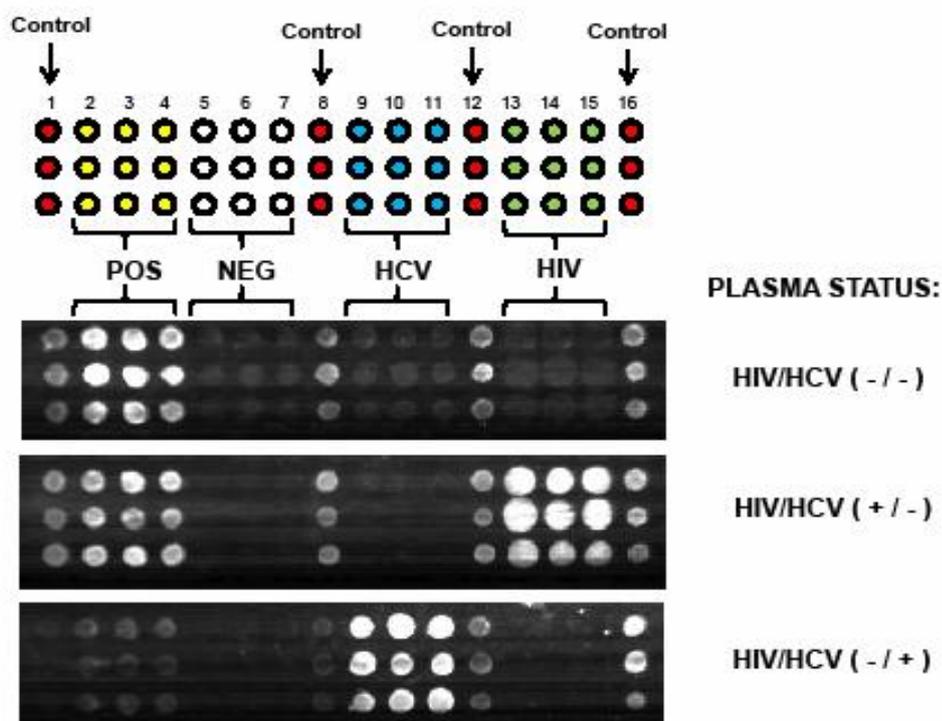
As etapas básicas do ensaio foram:

- (1) lavagem e bloqueio das tiras;



**HIV/HCV Serotyping Chip**  
**Print Lot#1006-89**  
 March 12, 2008

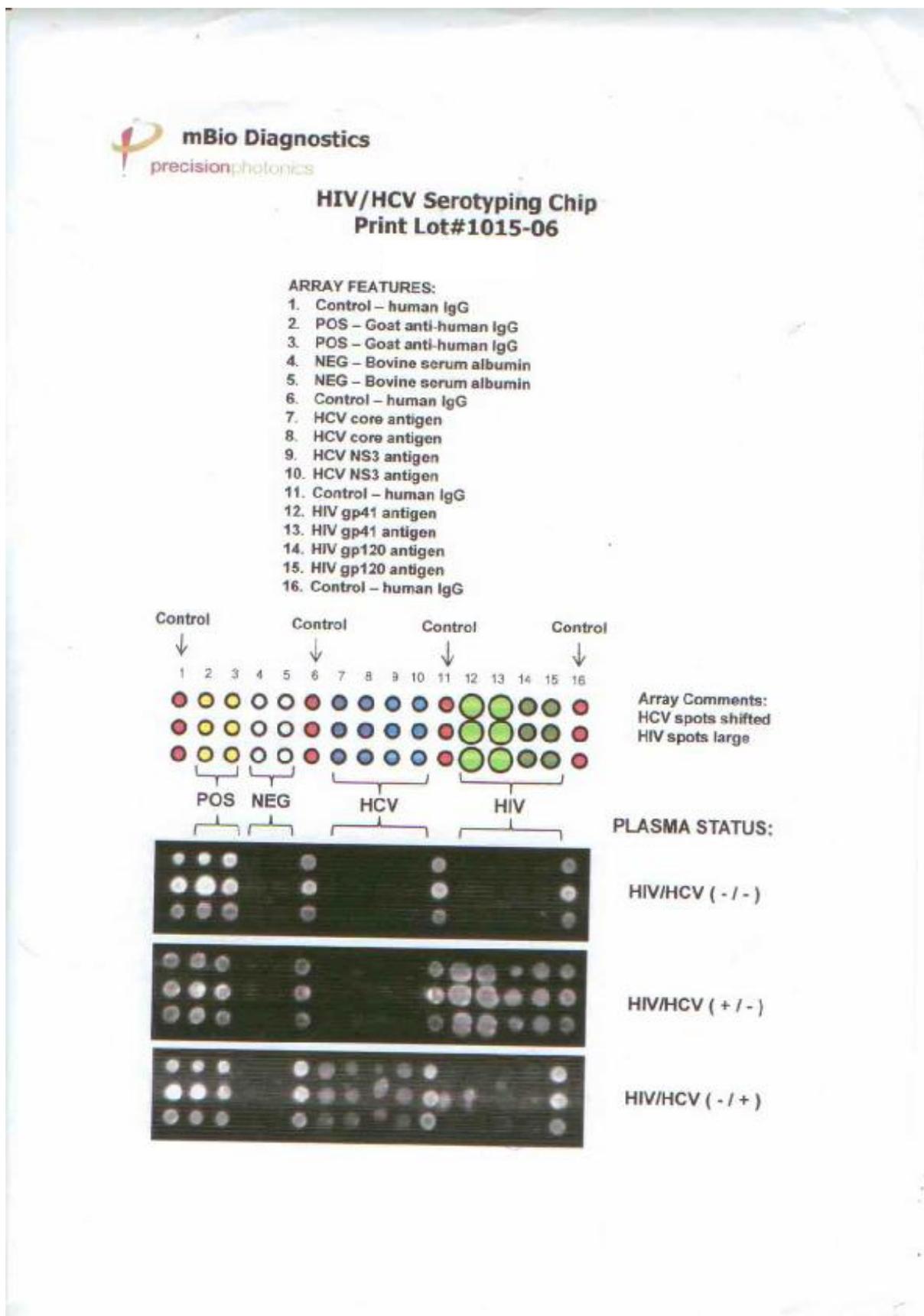
**ARRAY FEATURES:**  
 Control: Human IgG  
 POS (Positive): Goat anti-Human IgG  
 NEG (Negative): Bovine Serum Albumin  
 HCV: HCV core antigen  
 HIV: HIV envelope antigen, gp41



**Figura 10.** Protocolo 1 da PPC/mBio. Diagrama da disposição dos antígenos gp41 do HIV, core do HCV e controles positivos e negativos nas lâminas.

- (2) incubação com as amostras do soro humano;
- (3) incubação com anticorpo marcado;
- (4) enxágue, secagem e detecção da imagem no leitor (*Biochip Reader*).

As amostras humanas de soro com HIV/HCV (+/-), (-/+) e (-/-) foram oriundas do banco de soros do Laboratório de Medicina Tropical da Universidade Federal da Bahia. O tampão de bloqueio usado foi o tampão comercial Pierce, misturado na proporção de



**Figura 11.** Protocolo 2 da PPC/mBio. Diagrama da disposição dos antígenos gp41 e gp120 do HIV, core e ns3 do HCV e controles positivos e negativos nas lâminas.

1:1 com o tampão Tris -EDTA. A detecção do anticorpo marcado usado foi o anti-IgG humano Alexa 647 (Invitrogen/Molecular Probes).

#### Reagentes e suprimentos principais:

- Solução tampão: 10mM fosfato de sódio + 150mM NaCl (PBS), 0,05% Tween 20.
- Diluente para soro humano: (refrigerado) (50% PBS + 50% 1x stabilcoat [circulante 5x] em água deionizada) + 0,05% Tween 20.
- Diluente para anticorpos fluorescentes: PBS com 0,1% BSA e 0,05% Tween.
- Anticorpos fluorescentes: (refrigerado) anti-IgG humano Alexa 647.
- Tubos plásticos para imunoenaios.

#### 5.2. Análise dos dados e determinação do tempo de exposição

A análise dos dados foi realizada pelo *BCRanalysis*, software do *Biochip Reader*, que fez a análise dos pontos de imagem com programação específica, isto é, as intensidades dos pontos para HIV e HCV foram relativas aos controles positivos e negativos na mesma lâmina, e o *cut-off* (ponto inicial) foi definido nos procedimentos encaminhados pela PPC/mBio para designar o resultado positivo ou negativo, usando-se a pré-programação de < 255 ms, sem utilização do uso de subtração de *background* e imagens com 1280x1024 pixels.

## 6. Resultados

### **6.1. Lâminas sensibilizadas com HIV/HCV**

Foram selecionados 65 soros/plasma de pacientes conhecidamente positivos e negativos para HIV, HCV e HTLV e coinfectados. Desses, 52 foram escolhidos aleatoriamente da soroteca do Laboratório de Doenças Tropicais (entre os anos 2001 e 2003 - soros antigos), seguindo o protocolo 1 (Figura 10), e 13 (7 soros e 6 plasmas) foram colhidos durante o ensaio com o protocolo 2 (Figura 11).

Os soros dos pacientes foram identificados de acordo com a positividade ou negatividade isoladas ou com coinfeção, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3.** Amostras testadas de pacientes HIV, HCV, HTLV negativos e positivos e coinfectados.

Lâminas / Infecção	Pacientes (N = 65)				TOTAL GERAL
	HIV+	HIV-	HCV+	HCV-	
HIV*	25	0	0	25	25
HCV*	0	13	13	0	13
HTLV*	0	6	0	6	6
HIV+HCV	9	0	9	0	9
HIV+HTLV	6	0	0	6	6
HCV+HTLV	0	6	6	0	6
SUBTOTAL	40**	25**	25**	37**	65***

\* Apenas pacientes mono infectados. \*\* Total de pacientes com ou sem a infecção. \*\*\* Total geral dos pacientes.

Os resultados obtidos apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% quando correlacionados com os resultados já previamente conhecidos, oriundos da soroteca, que utilizaram o método por ELISA quando da coleta do material.

Em todos os pacientes HTLV positivos testados, não houve qualquer reação cruzada ou ruído de interferência nas áreas sensibilizadas com os antígenos específicos para HIV e HCV e com os controles, conforme exemplo da Figura 12.

Em 5 lâminas durante a utilização do protocolo 1 não houve bloqueio conforme determinava o procedimento encaminhado, contudo, isto não alterou os resultados finais. No restante das 47 amostras, seguiu-se com o protocolo 1 normalmente, e o resultado das mesmas foi compatível com os resultados previamente conhecidos dos pacientes (Figuras 13 a 16).

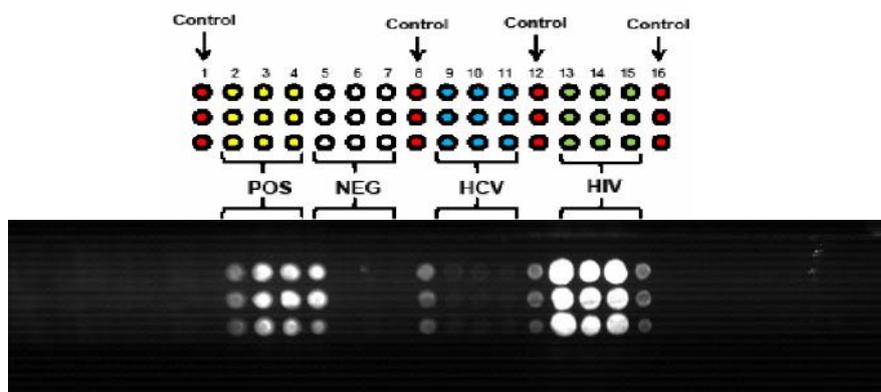


Figura 12. Paciente HIV/HTLV positivos. Slide mostra paciente HIV positivo.

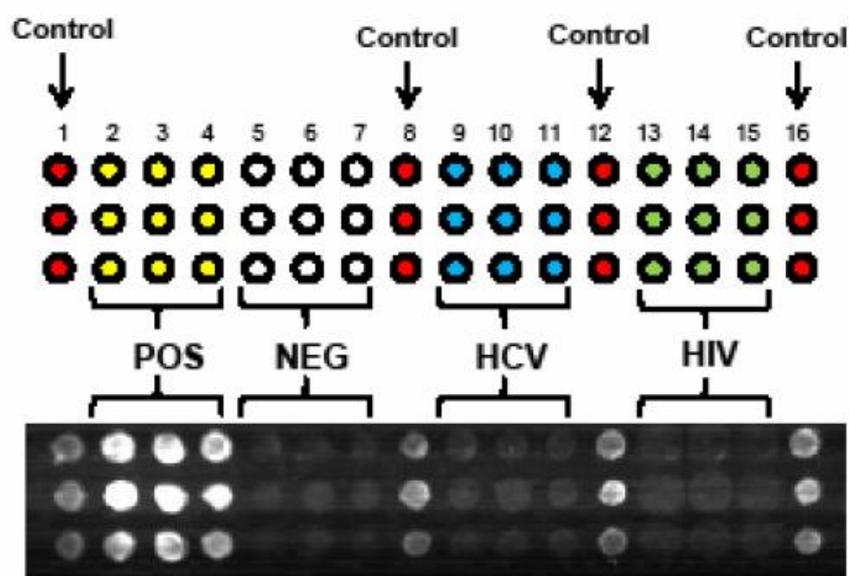


Figura 13. Paciente HIV, HCV e HTLV negativos. Slide mostrando paciente HIV/HCV negativos.

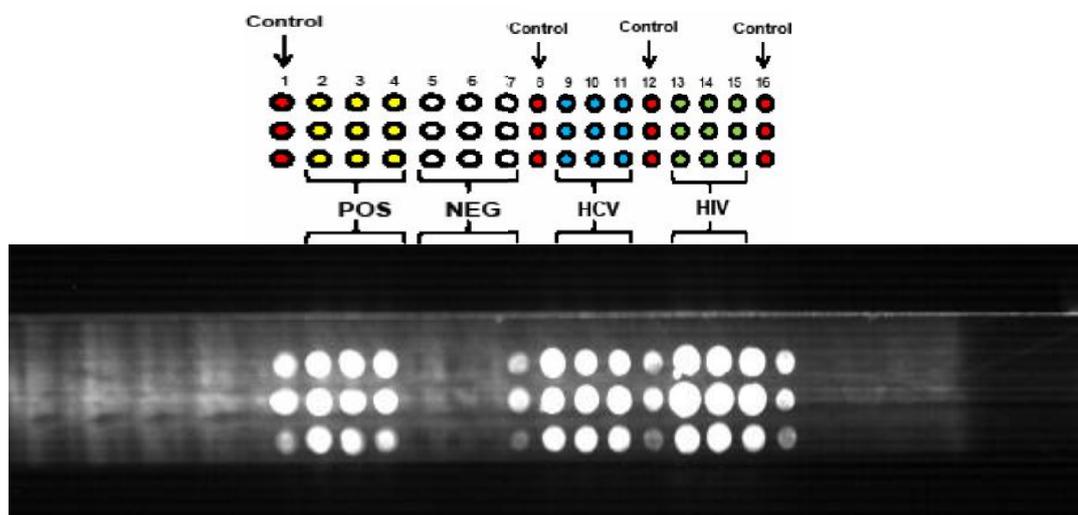


Figura 14. Paciente HIV/HCV positivo e HTLV negativo. Slide mostra paciente HIV/HCV positivo.

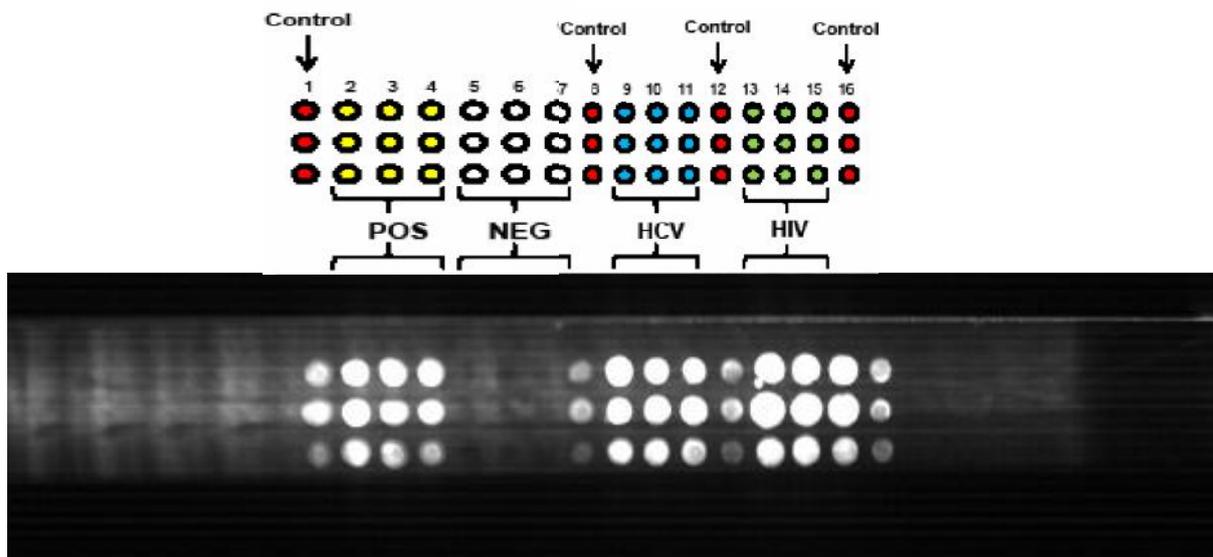


Figura 15. Paciente HIV/HCV positivo e HTLV positivo. Slide mostra paciente HIV/HCV positivo.

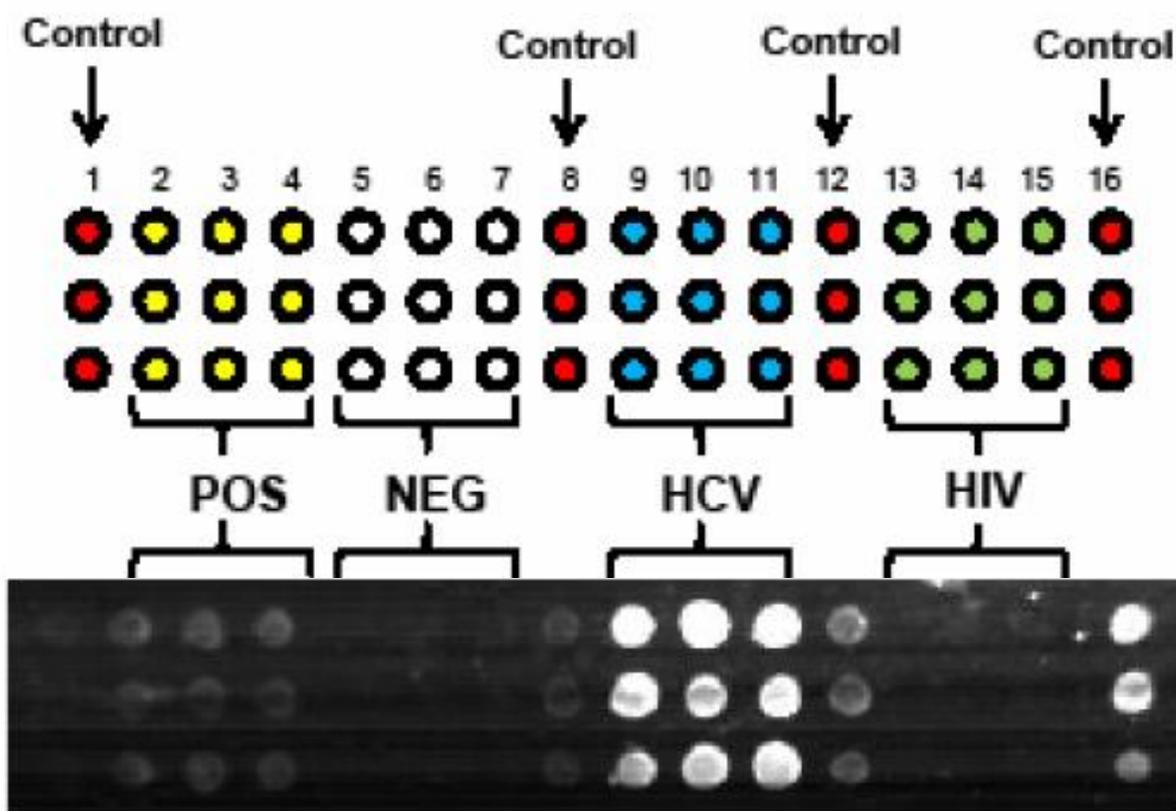


Figura 16. Paciente HCV/HTLV positivo. Slide mostrando paciente HIV negativo e HCV positivo.

## **6.2. Avaliação dos protocolos**

Em setembro de 2010, a PPC/mBio encaminhou 38 lâminas para teste seguindo novo protocolo (protocolo 2 - Figura 11). A Tabela 4 resume as ocorrências com este material encaminhado.

**Tabela 4.** Ocorrências com as lâminas encaminhadas pela PPC/mBio em setembro de 2010.

Ocorrências	Lâminas (N)
Falta de encaixe da lâmina na câmera do Biochip Reader	10
Contaminação por fungos	8
Não funcionamento do aparelho no momento da leitura (ausência de sinal, background)	7
<b>Total</b>	<b>25</b>

Assim, das 38 lâminas enviadas, apenas 13 lâminas foram testadas conforme o segundo protocolo, as quais foram também compatíveis com os resultados de ELISA, realizados logo após a coleta nos pacientes.

A falta de bloqueio em 5 lâminas durante a aplicação do protocolo 2 também não afetou os resultados finais (Figuras 17a, 17b, 17c - mesmo paciente - e 18a, 18b - outro paciente). As Figuras 19 a 22 apresentam alguns dos resultados das 13 lâminas testadas de acordo com o novo protocolo.

### **6.3. Análise dos dados**

A análise dos dados foi realizada pelo *BCRanalysis*, software do *Biochip Reader*, que fez a análise dos pontos de imagem com programação pré-específica pela PPC/mBio.

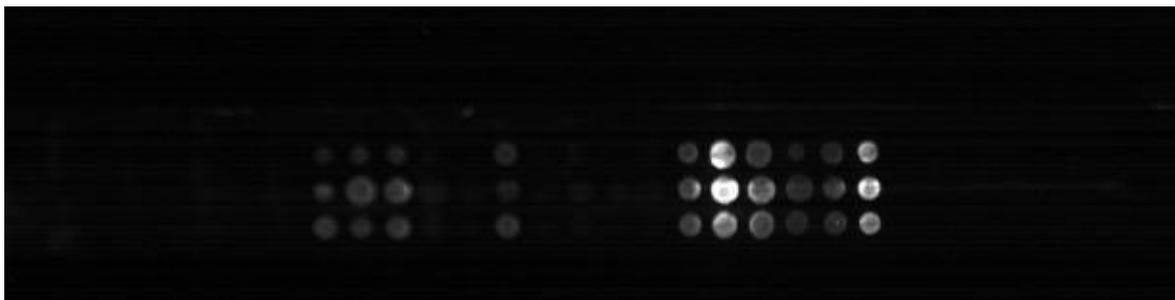
### **6.4. Tempo de exposição (protocolo 2)**

Pôde-se observar que, das 13 amostras analisadas, os testes que ficaram com o tempo de exposição em 50 ms obtiveram os melhores resultados (Tabela 5), sendo o tempo de exposição mais indicado durante esse experimento.

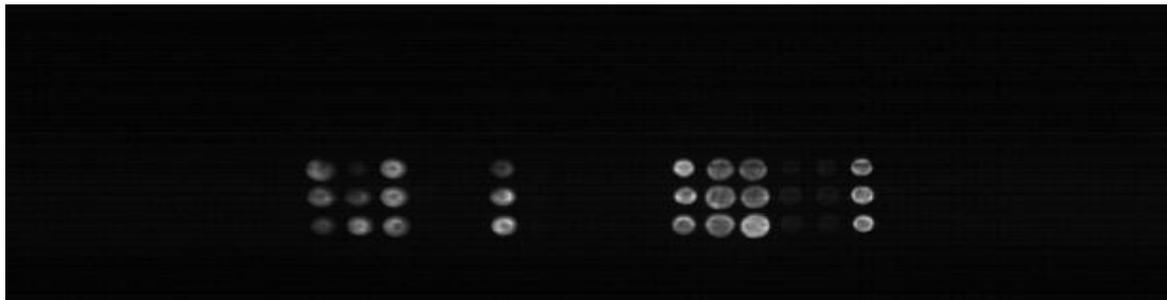
**Tabela 5.** Tempo de exposição (ms) das lâminas - média, mediana, moda.

<b>Tempo de exposição (ms)*</b>	
<b>N</b>	<b>Válido 13</b>
	<b>Não-Válidos 0</b>
Média/Mediana	57,92
Moda	50

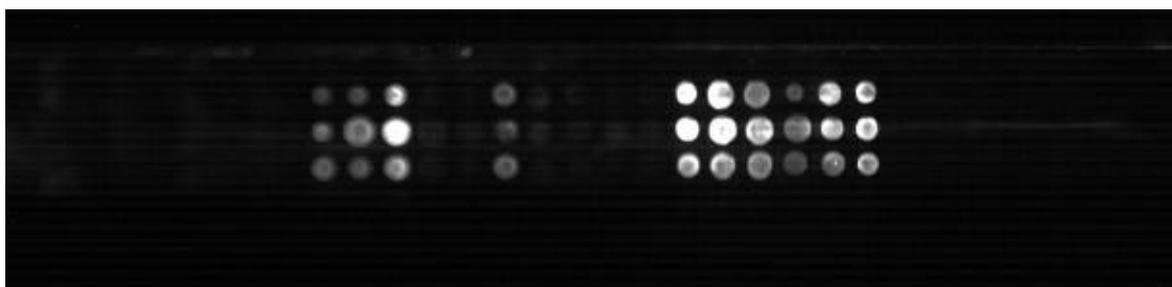
\* Utilização do programa SPSS, versão 7.1



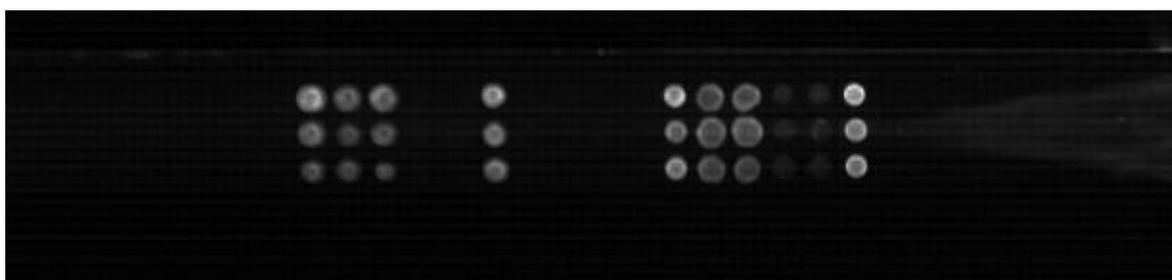
**Figura 17a.** Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Ocorreu falta de bloqueio na lâmina durante procedimento. Sinal para gp120 e controles positivos fracos.



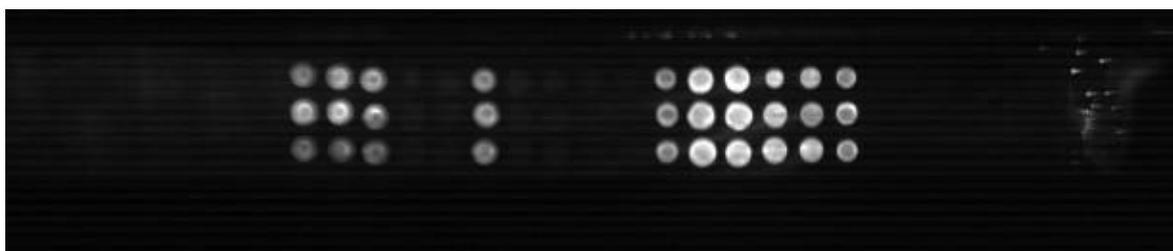
**Figura 17b.** Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal para gp120 e controles positivos fracos.



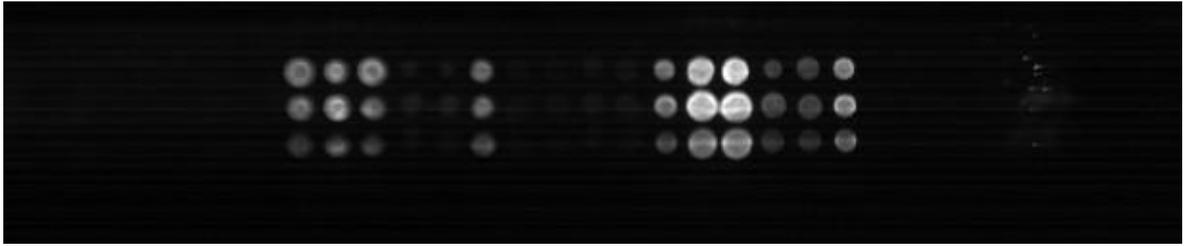
**Figura 17c.** Slide apresenta paciente PSCC HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal controles positivos fracos; gp 120 com sinal normal.



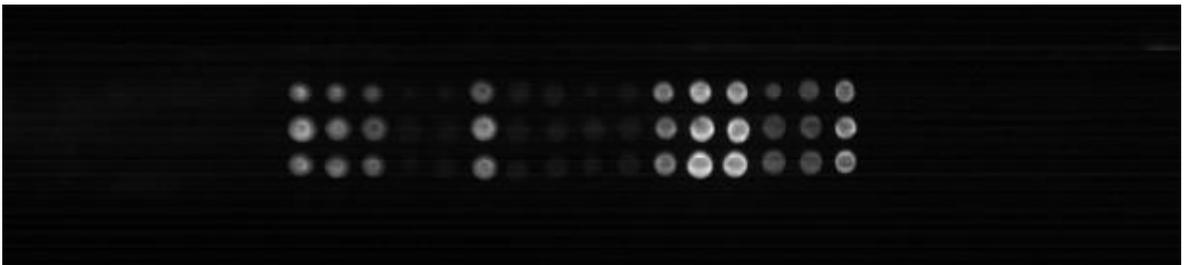
**Figura 18a.** Slide apresenta paciente AL HIV+. Ocorreu falta de bloqueio na lâmina durante procedimento. Sinal para gp120 fraco.



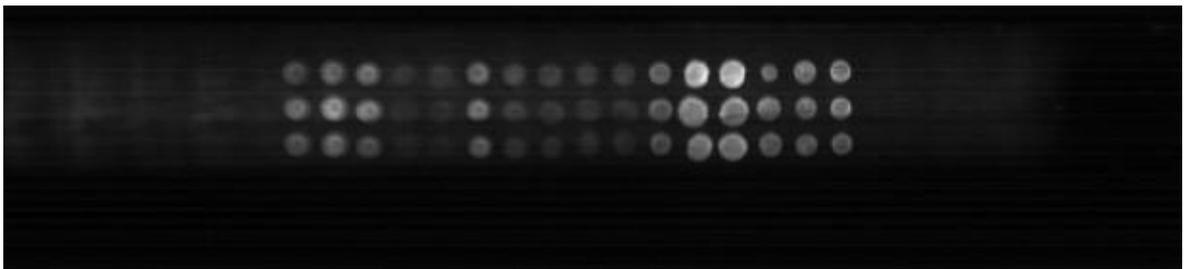
**Figura 18b.** Slide apresenta paciente AL HIV+. Uso correto do protocolo - realizado bloqueio. Sinal para gp120 normal.



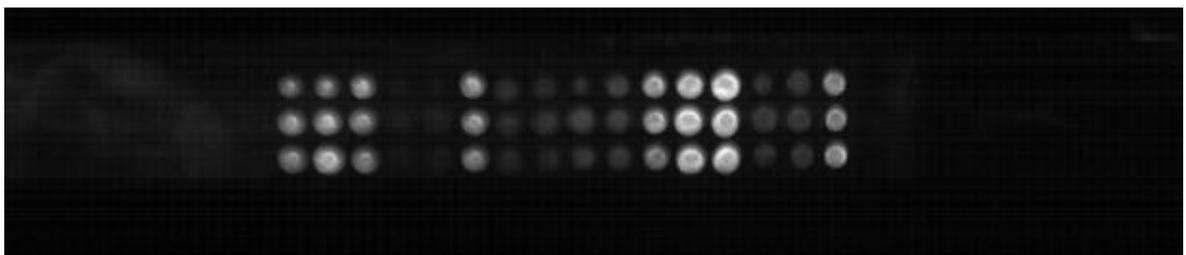
**Figura 19.** Paciente RPC - HIV positivo,. Sinal para gp120 muito fraco.



**Figura 20.** Paciente ESP - HIV positivo (coinfecção para citomegalovírus). Sinal para gp120 fraco.



**Figura 21.** Paciente RTC - HIV positivo, TB disseminada. *Background* para controles negativos e HCV.



**Figura 22.** Paciente EM - HIV/HCV/HTLV positivo. Notar gp120 fraco assim como *background* para os antígenos de HCV.

## 7. Discussão

Embora o avanço na miniaturização, desenvolvimento de sistemas portáteis e componentes eletrônicos e câmaras digitais terem possibilitado a descoberta do sistema de microarranjos com poder de análise simultânea de milhares de moléculas (NARANG *et al.*, 1998; TAITT *et al.*, 2004; LIGLER *et al.*, 2003; SAPSFORD *et al.*, 2001, 2003), tais como o protótipo do biossensor criado pelo NRL (LIGLER *et al.*, 2002; LIGLER *et al.*, 2007; RIPPEL, 2011; PANTIC, 2011; CHA, 2011), várias modificações, tais como aprimoramento técnico e diminuição de custos, ainda são necessários para tornar esta uma ferramenta viável para a utilização em larga escala.

Neste trabalho descrevemos uma plataforma *Biochip Reader* para diagnóstico que fornece uma análise de marcadores com uma única amostra, a um só tempo, usando uma lâmina descartável em circuitio integrado com um leitor de fluorescência baseado em condutores de onda planar e multimodo, capaz de ao mesmo tempo analisar diferentes testes para detecção de anticorpos específicos (HIV/HCV). Verificamos que a sensibilidade e especificidade de detecção foi de 100%, sem reatividade cruzada com outros conhecidos patógenos (HTLV e citomegalovírus), revelando a capacidade do sistema de manter a reação antígeno/anticorpo específico para a condição pesquisada. Também, analisamos criteriosamente todas as etapas e procedimentos técnicos, manuais e protocolos encaminhados pela PPC/mBio para a obtenção dos resultados.

Os resultados obtidos apresentaram boa fidedignidade do sistema, uma vez que mostrou sensibilidade de 100% para as amostras analisadas, além de ter revelado análises importantes quanto aos protocolos e procedimentos do método aplicado.

Contudo verificou-se que a baixa qualidade da lâmina manufaturada nos EUA pode ter interferido e afetado o experimento realizado aqui na Bahia (UFBA), uma vez que possivelmente não permitiu uma boa ligação antígeno-anticorpo e a ação do fluoróforo, por vezes apresentando enfraquecimento do sinal, presença de *background* ou nenhuma imagem nítida na emissão do sinal e conseqüentemente na leitura das mesmas.

Um dos primeiros pontos a ressaltar a respeito da qualidade do material a ser escolhido como substrato para o biorreceptor é o polimento das lâminas (GRACE, 2011; BATTISON, 2001). Battison (2001) e Vo-Dihn (1999) descrevem que o polimento do substrato é condição fundamental para a boa condução da onda e emissão do sinal. Assim, em nosso trabalho, pela baixa qualidade da lâmina, o polimento do vidro pode ter ficado prejudicado e não ter possibilitado a condução da onda evanescente de forma adequada,

o que foi decisivo para a apresentação dos controles fracos, presença de *background* e baixo sinal dos antígenos para HCV durante a utilização do protocolo 2. Além disto, Monk (2004) e Grace (2011) afirmam que para sistemas ópticos que utilizam condutores de onda planar devem ter seu substrato devidamente polido sob pena de não ser capaz de conduzir a onda de forma adequada e gerar sinais aleatórios ou inadequados.

Este fato também parece estar diretamente relacionado ao fato dos nossos controles positivos, apesar de terem aparecido em todos os testes, tornarem-se mais fracos a cada dia do experimento e em ordem sequencial, o que pode remeter à questão do polimento. Segundo Feldstein (1999), um biossensor de fluorescência, baseado em condutores de onda planar, funcionará adquadamente, se a superfície da base do biochip, seja ele de vidro, sílica ou outro material apropriado, estiver devidamente polido na sua extremidade de entrada da luminescência para que o sinal possa ser conduzido adequadamente. Este pode ser um dos fatores que tenham deixado todos os controles positivos fracos na primeira posição, de acordo com o protocolo 2.

Não foi possível determinar se a contaminação por fungos se deu pela qualidade das lâminas, transporte, excesso de umidade presente em nosso meio ou armazenamento inadequado, pois as lâminas foram acondicionadas em geladeira comum a todos os integrantes do Laboratório de Doenças Tropicais, sem que houvesse um controle de temperatura adequado. Contudo, segundo Vo Dihn (1999) e Thomson, 2011, os biossensores não devem ter muitas especificações quanto a armazenamento e manipulação, uma vez que o intuito é criar um sistema portátil e de fácil manuseio.

As lâminas apresentaram formação de cristais e excesso de trealose que, de acordo com Ziegler (2004), pode ser causado pelo aumento de temperatura. Isto nos leva novamente à importância da escolha do substrato para a impressão dos biochips, do polimento e do pré-bloqueio, com lavagens adequadas para que não haja a fixação de resíduos de açúcares que possam interferir nos resultados, com formação de *backgrounds* (ruídos), ou incapacidade de emissão de sinal e leitura (ALBERT, 2000; HERRON *et al.*, 2005).

Contudo, um ponto extremamente positivo é que, apesar das ocorrências nos sinais, houve uma sensibilidade de 100% nas amostras analisadas. Além disto, ressalte-se que os soros utilizados durante os procedimentos do protocolo 1 eram antigos, entre os anos de 2001 e 2003, e isto não pareceu alterar os resultados, apesar de se saber que com o tempo, descongelamento, recongelamento, a titulação e a degradação dos

anticorpos ocorrem. Porém isto não afetou o resultado final. Também, foram utilizados plasma e soro durante o procedimento com o protocolo 2 (setembro de 2010) e não houve evidência de qualquer alteração em relação aos resultados obtido em comparação com os resultados pelo método de ELISA realizado concomitantemente durante este experimento.

A utilização de dois protocolos para os testes realizados na Bahia ocorreu em virtude da emissão de sinais maiores e mais fortes na região do gp 41 do HIV, apresentando um “arredondamento” (*ballooning*) da área estabelecida para o gp41 do HIV durante a realização do experimento com o protocolo 1 (Figuras, 10, 15 e 16). Este fenômeno pode gerar dúvidas quanto à verdadeira ligação nas biomoléculas aderidas aos *spots*, pois é como se ocorresse um transbordamento e a ligação pudesse ocorrer fora do espaço impresso previamente, emitindo sinais mais fortes (> 255 ms), prejudicando assim a leitura das lâminas (LOCHHEAD, 2008). Isto se deve ao tamanho da proteína e foi ajustado no segundo protocolo encaminhado, já com os *spots* pré-impresos para o gp41 do HIV maiores, ajustando o tamanho também no software do *Biochip Reader* para que a leitura e análise não deixassem dúvidas quanto à acurácia dos resultados.

Segundo Lochhead (2008), Hoffman (2002) e Macbeath (2000), o pré-bloqueio e a impressão nos circuitos integrados das biomoléculas são fases pontuais para a formação do biochip. Os nossos resultados apresentaram um excelente pré-bloqueio feito pela PPC/mBio, uma vez que as alterações feitas nos procedimentos, sem o tamponamento das lâminas, não trouxeram diferenças para o resultado final. Estas determinações foram importantes para o resultado das análises, uma vez que demonstrou o perfeito funcionamento do *Biochip Reader* durante o experimento com as 65 amostras.

Porém, vale ressaltar que o segundo protocolo encaminhado trouxe impresso, além dos elementos do primeiro protocolo, o gp120 do envelope viral do HIV e a proteína NS3 do HCV, os quais se mostraram extremamente fracos nos testes. Este fato pode estar relacionado ao “*imprinting*” realizado pela PPC, fazendo com que as moléculas fossem “arrastadas” durante o processo de lavagem e demais procedimentos do protocolo, ou ainda traz a questão da qualidade das lâminas, umidade, formação de cristais, resíduos de trealose, temperatura, armazenamento, que poderiam estar “competindo” com os sítios de ligação nos *spots* (MACBEATH, 2000).

O tempo de exposição também foi um outro fator importante observado no experimento, uma vez que os testes realizados com o protocolo 2 estavam muito abaixo dos 255 ms

estipulados como *cut-off* para leitura, sendo o melhor tempo de exposição = 50ms, sem utilização do uso de subtração de *background* e imagens com 1280x1024 pixels.

O tempo de exposição é um dos fatores determinantes para o conhecimento da sensibilidade e especificidade nos testes de biossensores ópticos baseados em multiarranjos, uma vez que a quantidade de ms é fundamental para a fidedignidade dos testes a fim de não indicarem falsos-positivos e falsos-negativos (LOCHHEAD, 2008). Devido às diferenças entre as fibras ópticas, há, por vezes, uma grande dificuldade em normalizar o sinal de uma fibra com o sinal de outra fibra nos biossensores e esta é uma questão que pode levar à variação do tempo de exposição a que cada fibra possa ser submetida (HERRON *et al.* 1996, 2005, 2006). Como cada anticorpo possui uma certa fluorescência intrínseca e para que não haja grandes variações nas leituras, os fluoróforos são inseridos a fim de que os sinais se tornem estáveis para a leitura durante a análise (LEE, 2009; GRACE, 2011). Porém, se o tempo de exposição não for “normalizado”, ou pré-programado no substrato óptico utilizado, não haverá uma estabilidade quanto ao tempo de exposição e (LIGLER 2002, 2007; KENNETH, 2010; HERRON 1996, 2006) e o mesmo sofrerá grandes variações de leituras para um mesmo biorreceptor.

Um outro ponto também que pode estar relacionado aos resultados obtidos em relação ao tempo de exposição é que o limite inferior de detecção em relação ao sistema ocorre mais provavelmente em função das limitações da transferência de massa em vez do sinal de transdução da fluorescência. A transferência de massa é há muito reconhecido como uma limitação neste tipo de sistema de microarranjos (LEE, 2009; KENNETH, 2010), o que pode ter levado ao enfraquecimento dos sinais, falta de leitura adequada, ou baixo de tempo de exposição para os testes realizados com o protocolo 2.

Mesmo apresentando essas questões pontuais e o estudo piloto ter um universo total de apenas 65 amostras, os testes mostraram-se bastante sensíveis e específicos. Contudo, fica evidente que mais experimentos e maiores aperfeiçoamentos são necessários para termos um sistema de detecção de patógenos com o objetivo de torná-lo viável ao seu propósito: rapidez, economia e praticidade no diagnóstico simultâneo de diversas infecções que acometem o homem, com pouca amostra e pouca habilidade de manuseio do sistema.

O que esta análise de dados também deixou clara foi que cada antígeno irá requerer testes em concentrações diferentes no mesmo bloqueador e amostras de soro de pacientes e suas diluições, para determinar especificamente quais concentrações de

antígenos, bloqueadores e diluições das amostras de soro deve-se ter; o que permitirá a melhor sensibilidade e especificidade de detecção neste formato multianalito.

Este projeto inovador, que resulta da parceria entre quatro entidades: a Universidade Federal da Bahia, através do Laboratório de Doenças Tropicais da Unidade Docente Assistencial de Infectologia (UDAI) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), a Photonic Precision (EUA), a m/Bio Inc. e a Divisão de Doenças Infecciosas e Imunologia da Universidade de San Diego (UCSD), na Califórnia, EUA, ainda se encontra em fase de desenvolvimento, sendo necessários ainda um volume maior de dados e maior aprimoramento técnico para a validação final deste sistema de leitor de circuito integrado *Biochip Reader* como uma ferramenta eficaz, de baixo custo, de fácil manuseio e portátil para o diagnóstico de doenças infecciosas.

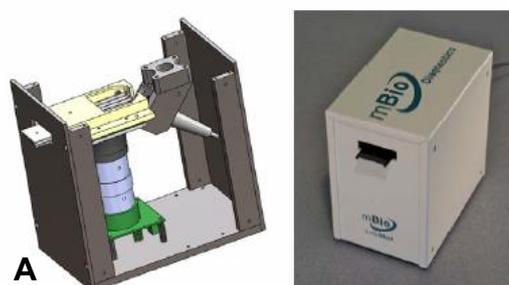
## 8. Conclusão

Apesar dos experimentos realizados no Brasil terem apresentado resultados satisfatórios quanto à operacionalidade do sistema de leitor de circuito integrado (*Biochip Reader*) da PPC/mBio Inc. no diagnóstico para detecção de anticorpos contra HIV e HCV, com uma sensibilidade de 100% das amostras analisadas e quanto à avaliação dos protocolos encaminhados, são necessários ainda ajustes para que o *Biochip Reader* da PPC/mBio se torne uma ferramenta eficaz, de baixo custo, portátil e de fácil manuseio, tais como:

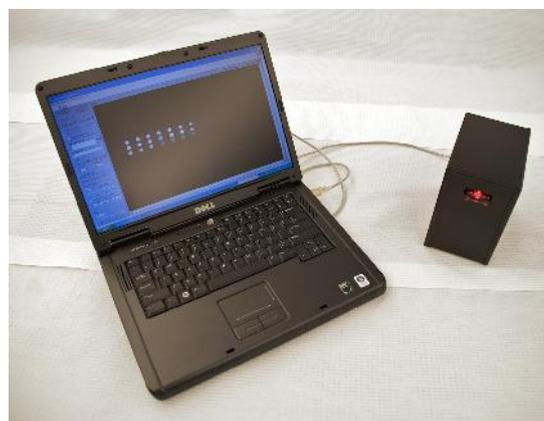
- Volume amostral maior
- Aprimoramento técnico (lâminas/cartuchos)
- Otimização dos protocolos
- Padronização do tempo de exposição sem grandes intervalos

## 9. Perspectivas Futuras

Após os resultados dos testes realizados Brasil e da continuação do desenvolvimento do protótipo inicial do Biochip Reader, a PPC e a m/Bio, juntamente com a Universidade de San Diego, atualizaram o modelo, com ferramentas mais resistentes, aprimoramento técnico e aperfeiçoamento tecnológico do biossensor, dos biorreceptores e do biochip, com inovação do design das lâminas (cartuchos), melhor polimento das áreas de fixação antígeno-específica, novos modelos de lentes e filtros ópticos, sistema de canal fluídico mais adequado a uma transferência de massa, expansão do painel de controles e novo protocolo, um software mais adequado e de fácil uso e manuseio, com maior grau de automação e menor possibilidade de manipulação por parte do usuário (Figuras 23 e 24).

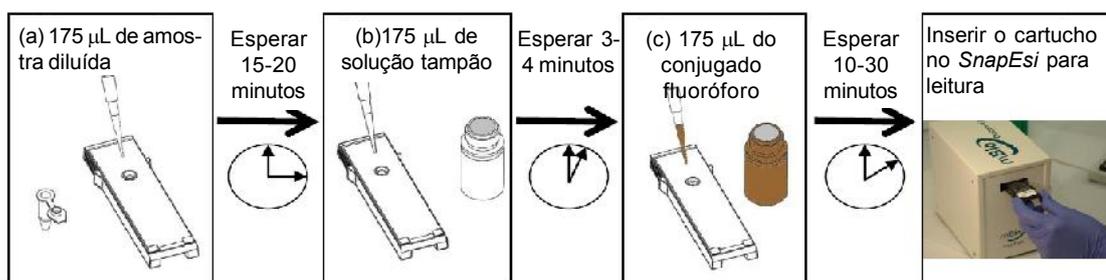


**Figura 23.** A. Modelo esquemático do condutor de onda e o novo cartucho. B. Figura do novo *Biochip Reader*.



**Figura 24.** Novo protótipo do biossensor da PPC/mBio.

Em julho de 2011, a PPC e a mBio encaminharam ao Brasil o novo protótipo (Figura 25) com os novos cartuchos, protocolos e procedimentos mais céleres para validação de testes para HIV, HCV, HBV, *T. pallidum* e *T. gondii*. As atividades estão em andamento e prometem resultados promissores para a fase final de validação dos testes e encaminhamento ao FDA para a aprovação deste biossensor.



**Figura 25.** Protocolo de uso do novo cartucho.

## 10. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 6ª edição, 2008.

ALBERT, K.J. *et al.* Cross-reactive chemical sensor arrays. **Chem Rev**, n.7, p. 2595-2626, 2000.

ANDERSON, G.P. *et al.* A fiber optic biosensor - combination tapered fibers designed for improved signal acquisition. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 5, p. 249-256, 1993a.

\_\_\_\_\_. Fiber optic-based biosensor - applications in environmental monitoring. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 197, 1993b.

BAKALTCHEVA, I.B. SHRIVER-LAKE, L.C.; LIGLER, F.S. A fiber optic biosensor for multianalyte detection: importance of preventing fluorophore aggregation. **Sensors and Actuators B-Chemical**, n. 1-3, p. 46-51, 1998.

\_\_\_\_\_. Multi-analyte explosive detection using a fiber optic biosensor. **Analytica Chimica Acta**, n. 1-2, p. 13-20, 1999.

BARNETT, D.; SADIK, O.; JOHN, M.J.; WALLACE, G.G. Pulsed amperometric detection of Thaumatin using antibody-containing poly(pyrrole) electrodes. **Analyst** 1997;119.

BATTISON, F.M. *et al.* A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout. **Sens Actuators** 2001;77:122131.

BLONDER, R.; LEVI, S.; TAO, G. *et al.* Development of amperometric and microgravimetric immunosensors and reversible immunosensors using antigen and photoisomerizable antigen monolayer electrodes. **J. Am. Chem. Soc.** 1997;119,10467-10478.

CHA, T.G. *et al.* Optical nanosensor architecture for cell-signaling molecules using DNA aptamer-coated carbon nanotubes. **ACS Nano**, 2011 May 24;5(5):4236-44.

CHITTUR, K.K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterials surfaces. **Biomaterials**, n. 19, p. 357-369, 1998.

CLARK, Jr., L.C. Monitor and control of blood tissue O<sub>2</sub> tensions. **Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs**, n. 2, p. 41-84, 1956.

COHEN, Y.; LEVI, S.; RUBIN, S.; WILLNER, I. Modified monolayer electrodes for electrochemical and piezoelectric analysis of substrate-receptor interactions: novel immunosensor electrodes, **J. Electroanal. Chem.** 1997;417:65-75.

CONROY, D. *et al.* **Biosensing for the Environment and Defence: Aqueous Uranyl Detection Using Bacterial Surface Layer Proteins**. **Sensors** 2010, 10(5), 4739-4755; doi:10.3390/s100504739,

CUKOR, G. Biological activity of heated Diphtheria toxin. **Journal of Bacteriology**, n. 1, p. 277-283, 1973.

D' ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clin Chim Acta**, 2011 Sep 18;412(19-20):1749-61.

DEREK, S. Emil von Behring won the very first Nobel Prize for Medicine or Physiology, in 1901. **Memoirs of the American Philosophical Society**, n. 255, p. 580, 2007a.

\_\_\_\_\_. Emil von Behring: Infectious Disease, Immunology, Serum Therapy. **JAMA**, p. 2539-2540, 2007b.

DESIKAN, R.; HAGENBEEK, D.; NEILL, S.J.; ROCK, C.D. **Febs Lett** 1999;456:257-262.

DISLEY, D.M.; MORRILL, P.R.; SPROULE, K. *et al.* **Biosens Bioelectron** 1999;14:481-493.

DUVENECK, G.L. *et al.* Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. **Sensors and Actuators**, p. 38-39, 88-95, 1997.

ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. **Biochim Biophys Acta**, n. 3, p. 427-434, 1971.

\_\_\_\_\_. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **J Immunol**, n. 1, p. 129-135, 1972.

FANG, X.H.; TAN, W.H. **Anal Chem** 1999;71 :3101-3105.

FELDSTEIN, M.J. *et al.* Array biosensor: optical and fluidics systems. **Journal of Biomedical Microdevices**, n. 1, p. 139-153, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov/mow/intro](http://www.cfsan.fda.gov/mow/intro)>. Acesso em 20 set. 2007.

FORTINA, P. *et al.* Surrey in biochip technology. J. Cheng and L. J. Kricka, eds., ch. Technology Options and Applications of DNA Microarrays. **Harwood Academic Publishers**, Philadelphia, p. 185-216, 2001.

FORUM ON MICROBIAL THREATS. Addressing Foodborne Threats to Health: Policies, Practices, and Global Coordination: Workshop Summary. Washington (DC): **National Academies Press** (US); 2006.

FRENESIUS, J. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Anal Chem** 2000;366 :540-551.

GOLDEN, J.P. Chemical sensor using two-dimensional lens array. **US Patent**, v. 5, n. 827, p. 748, 1998.

\_\_\_\_\_. *et al.* A portable automated multianalyte biosensor. **Talanta**, n. 5, p. 1078-1085, 2005.

**GOULART, N.K; KOST, G.J.** Worldwide point-of-care testing: compendiums of POCT for mobile, emergency, critical, and primary care and of infectious diseases tests. **Point of Care: the Journal of Near-Patient Testing & Technology** 2010 (5):84–92, 2010.

GRACE, K.; SWANSON, B. Optical Biosensor Reagentless (ROB). **Los Alamos National Laboratory**, Los Alamos Biosensor Team, 2011.

HALL, E.A.H. Biosensors. Milton Keynes, UK: **Open University Press**, 1990.

HEIDELBERGER, M. Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions. **Bacteriol Rev**, n. 1, p. 49-95, 1939.

\_\_\_\_\_. National Academy of Sciences Conference on complement. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, n. 3, p. 185-189, 1951.

HERRON, J.N. *et al.* Waveguide immunosensor with coating chemistry providing enhanced sensitivity. **US Patent**, v. 5, n. 512, p. 492, 1996.

\_\_\_\_\_. *et al.* Apparatus and methods for multi-analyte homogeneous fluoro-immunoassays. **US Patent**, v. 5, n. 677, p.196, 1997.

\_\_\_\_\_. *et al.* Fluorescence Sensors and Biosensors. **Taylor & Francis CRC Press**, Boca Raton, FL, 2005, 283-332.

\_\_\_\_\_. *et al.* Planar Waveguide Biosensors for Point-of-Care Clinical and Molecular Diagnostics. In: Thompson RB, ed. Fluorescence Sensors and Biosensors, Vol. Boca Raton, FL: CRC Press **Taylor & Francis Group**, 2006.

HOMOLA, J.; LU, H.B.; YEE, S.S. *et al.* **Electron Lett** 1999;35:1105-1106.

HUGHES, W.S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with water. **J Am Chem Soc**, n. 44, p. 2860-2866, 1922.

IQBAL, S.S. *et al.* A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 15, p. 549-578, 2000.

JAIN, K.K, Nanotechnology in Clinical Laboratory Diagnosis. **Clinica Chemica Acta** 2005; 358: 37-54.

KENNETH, E. *et al.* Biomedical Nanostructures. **JohnWiley&Sons**, Inc. 2010;Chapter 17.

KNOP, L. Estudo Piloto para avaliar a Utilização da Nova Tecnologia de Biossensor no Doagnóstico das Doenças Infecciosas. **Monografia apresentada como exigência para a obtenção do Título de Bacharel em Biomedicina à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública do Curso de Biomedicina**. Salvador, BA, 2007.

KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. Nanotechnology on duty in medical applications. **Curr Pharm Biotechnol** 2005;6:1733.

LEE, Y.E., SMITH, R.; KOPELMAN, R. Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells and *in vivo*. **Annu Rev Anal Chem** (Palo Alto Calif). 2009;2:57-76.

LIGLER, F.S. *et al.* Integrating waveguide biosensor. **Analytical Chemistry**, n. 3, p. 713-719, 2002.

\_\_\_\_\_. *et al.* Array biosensor for detection of toxins. **Anal Bioanal Chem**, n. 3, p. 469-477, 2003.

\_\_\_\_\_. *et al.* The array biosensor: portable, automated systems. **Anal Sci**, n. 1, p. 5-10, 2007.

LI, J.; WANG, K.M.; YANG, X.H.; XIAO, D. **Anal Commun** 1999;36 :195-197.

LIMA, J.L.; LOURO, A.P.; LOURO, I. Biochips: Pesquisa & Prática. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 5, n. 17, p. 6-9, 2002.

LIN, K.C. *et al.* Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. **Biosens Bioelectron** 2010;25:2336-42.

LIU XI., TAN W.H. **Mikrochim Acta** 1999;131:129-135.

LOCHHEAD, M.J.; DELANEY, M.; RADKA, S. *et al.* Low-Cost, Multiplexed Biosensor Technology for Simultaneous Analysis of HIV and Common Co-Infections. **AACC Annual Meeting**, Vol. Washington, D.C., 2008.

LU, B.; LU, C.; WEI, Y. A planar quartz waveguide immunosensor based on the total internal reflection fluorescence principle. **Analytical Letters**, n. 25, p. 1-10, 1992.

MACBEATH, G.; SCHREIBER, S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. **Science**, n. 5485, p. 1760-1763, 2000.

MAYES, A.G.; BLYTH, J.; KYROLAINEN-REAY, M. *et al.* **Anal Chem** 1999;71:3390-3396.

MCDONAGH, C.; STRANIK, O.; NOONEY, R.; MACCRAITH, B.D. Nanoparticle strategies for enhancing the sensitivity of fluorescence-based biochips. **Nanomedicine** (Lond). 2009 Aug;4(6):645-56.

MOHAPATRA, D.P.; GASSARA, F.; BRAR, S.K. Nanoparticles - production and role in biotransformation. **J Nanosci Nanotechnol**, 2011 Feb;11(2):899-918.

MONK, D.J.; WALT, D.R. Optical fiber-based biosensors. **Anal Bioanal Chem** 2004;379:931-945.

NARANG, U. *et al.* Multianalyte detection using a capillary-based flow immunosensor. **Analytical Biochemistry**, n. 1, p. 13-19, 1998.

NEWMAN J.D. *et al.* Biosensors: A Clearer View. UK: **Cranfield University Press**; 1999;p216.

O'CONNELL, K.P.; VALDES, J.J.; AZER, N.L. *et al.* **J Immunol Methods** 1999;225:157-169.

PANTIC I. Nanoparticles and modulation of immune responses. **Sci Prog.**, 2011;94(Pt 1):97-107.

PEJCIC M., GERALD J. Goals, guidelines and principles for point-of-care testing. *Principles & practice of point-of-care testing*. Hagerstown, MD: **Lippincott Williams & Wilkins**. pp. 3–12, 2006.

PLOWMAN, T.E.; SAAVEDRA, S.S.; REICHERT, W.H. Planar integrated optical methods for examining thin-films and their surface adlayers. **Biomaterials**, n. 19, p. 341-355, 1998.

PRINGSHEIM, A.N.; WILSON, W.W.; OLDHAM, P.B. Regenerable biosensor platform: a total internal reflection fluorescence cell with electrochemical control. **Analytical Chemistry**, n. 70, p. 1156-1563, 1999.

RABBANY, S.Y., DONNER, B.L. LIGLER, F.S. Optical immunosensors. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, n. 22, p. 307-346, 1994.

RAMON, G. On booster shots in the practice of vaccination by anatoxins and especially tetanus anatoxin. **Rev Immunol Ther Antimicrob**, 1963 Jan-Mar;27:1-7.

RIPPEL, R.A.; SEIFALIAN, A.M. Gold revolution - gold nanoparticles for modern medicine and surgery. **J Nanosci Nanotechnol**, 2011 May;11(5):3740-8.

ROWE C.A. *et al.* Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. **Thromb Haemost**, n. 1, p. 94-98, 1998.

\_\_\_\_\_. *et al.* An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. **Anal Chem**, n. 2, p. 433-439, 1999.

\_\_\_\_\_. *et al.* Array biosensor for detection of biohazards. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 10-11, p. 785-794, 2000.

RUSSELL, R.J.; PISHKA, M.V.; GEFRIDES, C.C. *et al.* **Anal Chem** 1999;71:3126-3132.

SAMPIETRO, M.; BOTTANI, C.E.; CAMINATI, M. *et al.* Biosensors and molecular imaging. **IEEE Pulse**. 2011 May-Jun;2(3):35-40. doi: 10.1109/MPUL.2011.941521.

SAPSFORD, K.E. *et al.* Kinetics of antigen binding to arrays of antibodies in different sized spots. **Analytical Chemistry**, n. 73, p. 5518-5524, 2001.

\_\_\_\_\_. *et al.* Array biosensor for homeland defense. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, p. U107-U107, 2003.

\_\_\_\_\_. *et al.* Detection of *Campylobacter* and *Shigella* species in food samples using an array biosensor. **Analytical Chemistry**, n. 2, p. 433-440, 2004a.

\_\_\_\_\_. *et al.* Fluorescence-based array biosensors for detection of biohazards. **J Appl Microbiol**, n.1, p. 47-58, 2004b.

SHI, H. *et al.*, Part I: Recent Developments in Nanoelectrodes for Biological Measurements. **Nanomedicine** 2007; 2(5): 587-598.

SILVERSTEIN, A.M. Paul Erlich's receptor immunology: the magnificent obsession. **Hardcover**, 2002.

TAITT, C.R. *et al.* A portable array biosensor for detecting multiple analytes in complex samples. **Microb Ecol**, n. 2, p. 175-185, 2004.

VAN BINSBERGEN, J.; SIEBELINK, A.; JACOBS, A. *et al.* Improved performance of seroconversion with a 4th generation HIV antigen/antibody assay. **J Virol Methods** 1999;82:77-84.

VAZ, A.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, Capítulo 2, 2007.

VO-DINH, T. *et al.* Optical nanosensors for detecting proteins and biomarkers in individual living cells. **Clin Diagn Lab Immunol**, 1998 September; 5(5): 609–612.

\_\_\_\_\_. DNA biochip using a phototransistor integrated circuit. **Anal Chem** 2000 Jan 15;71(2):358-63.

\_\_\_\_\_. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **J Anal Chem** 2001;366:540-551.

WADKINS, R.M. *et al.* Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 13, p. 407-415, 1998.

WHO. Infectious diseases in all world. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 9, n. 8, p. 545-620, julho 2011.

XERRI, L. Biochips and their applications in pathology. **Ann Pathol**, n. 1, p. S35-S39, 2003.

YULDEV, M.F.; SITDIKOV, R.A.; DMITRIEVA, N.M. *et al.* Development of a potentiometric immunosensor for herbicide Simazine and its application for food testing. **Sens. Actuators B** 2001;75,129-135.

ZIEGLER, C. Cantilever-based biosensors. **Anal Bioanal Chem** 2004;379:946-959.