



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BASEADOS EM CARBONO
PARA DETERMINAÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA HUMANA

TATIANNY DE ASSIS FREITAS

Recife, PE

2014

TATIANNY DE ASSIS FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BASEADOS EM CARBONO
PARA DETERMINAÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biotecnologia, RENORBIO, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

Recife, PE

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Freitas, Tatianny de Assis

**Desenvolvimento de eletrodos baseados em carbono para
determinação da troponina T cardíaca humana/ Recife: O Autor, 2014.**

99 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Infarto do miocárdio I. Dutra, Rosa Amália Fireman
(orientadora) II. Título**

616.1237

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 054

TATIANNY DE ASSIS FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BASEADOS EM CARBONO
PARA DETERMINAÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA HUMANA**

DATA DA APROVAÇÃO: 17/01/2014

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra
(Depto. de Eng. Biomédica / UFPE) - Orientadora

Profa. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia
(Depto. de Genética/ UFRPE) 1º examinador

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Depto. de Bioquímica/ UFPE) 2º examinador

Profa. Dra. Adriana Fontes
(Depto. de Biofísica/ UFPE) 3º examinador

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos
(Depto. de Ciências Farmacêuticas/ UFPE) 4º examinador

Recife, PE

2014

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”*

José de Alencar

DEDICATÓRIA

A Deus pela força, saúde e fé para que eu pudesse finalizar esta importante etapa da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora **Rosa Fireman Dutra**, pela orientação, amizade, oportunidade e contribuição nesta minha fase de aprendizado.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (**FACEPE**) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, **Agrício** e **Graça**, pelo carinho, amor e principalmente por todas as oportunidades a mim oferecidas, para formação acadêmica e pessoal.

Ao meu querido marido e companheiro **Alexandre Sales**, pelo amor verdadeiro, apoio, paciência e incentivo em todos os momentos.

A todos os meus familiares e amigos, em especial a **Carminha**, que me incentivaram para a construção deste trabalho.

Às amigas **Alessandra Mattos** e **Bárbara Virgínia**, pela amizade, pelos momentos de descontração, apoio e pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do **LAPED**, com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado, pela contribuição no decorrer desta trajetória e pelos muitos momentos de descontração tornando o laboratório um ambiente mais prazeroso.

Aos **professores** e **funcionários do RENORBIO** que contribuíram para a formação do meu caráter e conduta científica.

AGRADEÇO

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. Infarto Agudo do Miocárdio - IAM	20
3.2. Marcadores Cardíacos	22
3.2.1 Troponinas	25
3.3. Biossensores	30
3.3.1. Imunossensores eletroquímicos	36
3.4. Eletrodos impressos	39
3.5. Modificação Eletródica	42
3.5.1. Nanotubos de carbono (NTCs)	43
3.5.2. Filmes poliméricos condutores	45
4. ARTIGO 01	47
Amino-functionalization of carbon nanotubes by using a factorial design: human cardiac troponin T immunosensing application.	
5. ARTIGO 02	73
An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum.	
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
7. REFERÊNCIAS	85

RESUMO

A troponina T (TnT) é um marcador cardíaco considerado "padrão ouro" para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Métodos analíticos para melhorar o diagnóstico desta doença são importantes para o tratamento adequado dos pacientes. Atualmente, as técnicas baseadas em imunoenaios são as mais utilizadas para diagnóstico clínico e determinação da TnT à beira do leito. Entretanto, apresentam algumas limitações como procedimentos complicados para análise e um elevado tempo de espera do resultado. Neste contexto, os imunossensores surgem como uma atrativa ferramenta, de baixo custo, com alta sensibilidade e especificidade para determinação da TnT. Nesta tese, dois diferentes imunossensores eletroquímicos foram desenvolvidos para a detecção da TnT em soro humano. O primeiro imunossensor foi baseado em um método simples de amino-funcionalização de nanotubos de carbono empregado para promover uma imobilização dos anticorpos anti-TnT através de sua região Fc e sua ligação orientada ao antígeno TnT. Os nanotubos de carbono de múltiplas paredes foram amino-funcionalizados utilizando o reagente etilenodiamina e os ensaios foram realizados através de um estudo fatorial associado com uma matriz de Doehlert. As modificações estruturais dos nanotubos de carbono foram confirmadas através da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Para detecção eletroquímica deste imunossensor, eletrodos impressos descartáveis de carbono foram utilizados e então modificados com estes nanotubos de carbono amino-funcionalizados. Um imunoenensaio tipo "sanduíche" foi realizado, no qual a captura específica da TnT foi avaliada através das reações redox da enzima peroxidase conjugada ao segundo anticorpo anti-TnT. Sob condições experimentais otimizadas, uma curva de calibração para as diferentes concentrações de TnT foi obtida com faixa linear de resposta entre 0,02 e 0,32 ng mL⁻¹ ($r=0,985$, $n=5$, $p<0.001$) e um limite de detecção de 0,016 ng mL⁻¹. O segundo imunossensor foi baseado na formação de um filme polimérico sobre um eletrodo de carbono vítreo para imobilização de anticorpos anti-TnT. O ácido *orto*-aminobenzóico (*o*-ABA) foi eletropolimerizado sobre a superfície do eletrodo e empregado para fornecer grupamentos carboxílicos à superfície e permitir a ligação covalente de anticorpos anti-TnT. O eletrodo apresentou-se estável mantendo 91,6% da sua resposta inicial após 18 dias e apresentou um limite de detecção de 0,015 ng mL⁻¹ de TnT. Os imunossensores desenvolvidos foram sensíveis, permitindo medidas confiáveis da TnT para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio na clínica médica.

Palavras-chave: infarto agudo do miocárdio; troponina T; imunoenensaio; imunossensor.

ABSTRACT

Troponin T(TnT) is a cardiac marker considered gold standard for the diagnosis of acute myocardial infarction due to its high sensibility and specificity. Analytical methods to improve the diagnosis of this disease are important to the appropriate treatment of patients. Currently, the techniques based on immunoassays are the most used for clinical diagnosis and determination of TnT in point of care. However, they present some limitations such as complicated procedures for analysis and a long wait time of the results. In this context, the immunosensors emerge as an attractive tool, low cost, with high sensitivity and specificity for the determination of TnT. In this thesis, two different electrochemical immunosensors were developed for TnT detection in human serum. The first immunosensor was based on a simple method of amino-functionalization of carbon nanotubes employed to promote an immobilization of anti-TnT antibodies through Fc region and their oriented binding to TnT antigen. Multi-walled carbon nanotubes were amino-functionalized using the reagent ethylenediamine and the assays were carried out through a factorial study associated with Doehlert matrix. Structural modifications of carbon nanotubes were confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy. For electrochemical detection of this immunosensor, disposable screen-printed carbon electrodes were used and then modified by these amino-functionalized carbon nanotubes. An immunoassay sandwich-type was performed, in which the specific capture of TnT was evaluated by redox reactions of the peroxidase enzyme conjugated to the second anti-TnT antibody. Under optimized experimental conditions, a calibration curve to different concentrations of TnT was obtained with linear range of response between 0.02 and 0.32 ng mL⁻¹ (r=0.985, n=5, p<0.001) and a limit of detection of 0.016 ng mL⁻¹. The second immunosensor was based on the formation of a polymeric film on aglassy carbon electrode for immobilization of anti-TnT antibodies. Ortho-aminobenzoic acid (o-ABA) was electropolymerized on the electrode surface and used to provide carboxylic groups on the surface and allow covalent binding of anti-TnT antibodies. The electrode was stable maintaining 91.6% of the initial response after 18 days and showed a good limit of detection of 0.015 ng mL⁻¹ TnT. The developed immunosensors were sensitive, allowing reliable measurements of TnT for the diagnosis of acute myocardial infarction in medical clinic.

Keywords: acute myocardial infarction; troponin T; immunoassay; immunosensor.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO DA LITERATURA

<i>Figura 1</i>	<i>Infarto do miocárdio após a oclusão de um ramo da artéria coronária esquerda.</i>	21
<i>Figura 2</i>	<i>Complexo troponina composto pelas três subunidades: T, C e I.</i>	26
<i>Figura 3</i>	<i>Desempenho dos principais marcadores cardíacos em pacientes com IAM.</i>	27
<i>Figura 4</i>	<i>Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene TNNT2 da cTnT humana.</i>	28
<i>Figura 5</i>	<i>Previsão da receita mundial de 2009-2016 em relação aos biossensores.</i>	30
<i>Figura 6</i>	<i>Percentuais do mercado mundial dos biossensores em 2009 e 2016.</i>	31
<i>Figura 7</i>	<i>Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor.</i>	32
<i>Figura 8</i>	<i>Desenho esquemático de um sistema eletroquímico com três eletrodos. (a) célula eletroquímica de vidro; (b) eletrodo de trabalho; (c) eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl saturado); (d) eletrodo auxiliar helicoidal de fio de platina e (e) tampa de PVC com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções.</i>	36
<i>Figura 9</i>	<i>Representação gráfica de um típico voltamograma cíclico obtido pela técnica de VC.</i>	38
<i>Figura 10</i>	<i>EIs disponíveis no mercado desenvolvidos em diferentes configurações.</i>	40
<i>Figura 11</i>	<i>Ilustração dos principais tipos de NTC: (a) NTCPS e (b) NTCPM.</i>	42
<i>Figura 12</i>	<i>Estrutura do ácido o-aminobenzóico (o-ABA).</i>	45

4. ARTIGO 1

Figura 1	Schematic illustration of stepwise assembling of the immunosensor.	63
Figura 2	Surface response obtained from the Doehlert design employed for the optimization of the EDA concentration and time of acid treatment of the EDA in the amino functionalization MWCNT procedure. The optimum conditions correspond to 70% and 2.5 h, respectively.	64
Figura 3	FTIR spectra of the MWCNTs (a) before and (b) after EDA treatment.	65
Figura 4	SEM image of working area of the SPCE (a) bare and (b) amino treated MWCNT modified.	66
Figura 5	Influence of (a) pH values, (b) ionic strength of the PBS and (c) the amount of the mAb-cTnT-HRP on the cathodic peak current of the SPCE. Measurements obtained by cyclic voltammetry experiments in presence of the $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$.	67
Figura 6	(a) Reproducibility and (b) repeatability of the SPCE to $2.5 \text{ ng mL}^{-1} \text{ cTnT}$.	69
Figura 7	Calibration curve of the resulting immunosensor for the detection of cTnT.	70

5. ARTIGO 2

Figura 1	Effect of the amount mAb-cTnT immobilized on the electrode surface.	75
Figura 2	Schematic diagram of the assembly of the poly(o-ABA) modified electrode.	76
Figura 3	Surface response obtained from the Doehlert desing employed for the optimization of the o-ABA electropolymerization. The optimum conditions correspond to 70 mV s^{-1} and $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$.	76

Figura 4	(a) Voltammograms recorded for the working electrode in $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ during the electrochemical oxidation of 10.0 mmol L^{-1} o-ABA. Scan rate 70 mV s^{-1} and 20 scans. (b) Atomic force micrograph image of the bare electrode (I) and poly(o-ABA) modified electrode (II). (c) CVs of the poly(o-ABA) modified electrode in $5.0 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ at different stages: bare electrode (I); poly(o-ABA) modified electrode (II); activation with EDC/NHS (III); mAb-cTnT immobilized on the electrode (IV).	77
Figura 5	CVs of the poly(o-ABA) modified electrode at different scan rates ($10\text{--}250 \text{ mV s}^{-1}$) (a). The inset shows the relationship between the peak currents and scan rate (b) and relationship between the peak currents and the square root of scan rate (c). Supporting electrolyte PBS containing $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ and 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone.	78
Figura 6	(a) Influence of various H_2O_2 concentrations on the peak current response in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone. (b) Influence of hydroquinone concentrations on the peak current response in PBS containing $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. (c) Influence of pH value on the peak current response in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$.	78
Figura 7	Calibration curve of the poly(o-ABA) modified immunosensor for samples of cTnT in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. The inset represents the linear fit of the calibration plot with correlation coefficient of 0.992 ($p < 0.0001$), $Y = 0.263 + 1.011X$.	79
Figura 8	(a) Reproducibility study different electrodes ($n=10$) prepared in the same conditions; (b) operational stability ($n=100$); (c) lifetime of the immunosensor in 20 days (stored 4°C at 0.1 mol L^{-1} PBS). The cTnT sample (1.0 ng mL^{-1}) of the poly(o-ABA) modified electrode was measured by CVs in PBS containing $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ and 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone.	79
Figura 9	Calibration curve of the poly(o-ABA) modified immunosensor for samples of cTnT in human serum.	80

Current response obtained in PBS containing 0.5 mmol L⁻¹ hydroquinone and 1.0 mmol L⁻¹ H₂O₂. The inset represents the linear fit of the calibration plot with correlation coefficient of 0.992 ($p < 0.0001$).

LISTA DE TABELAS

4. ARTIGO 1

<i>Tabela 1</i>	<i>Experimental factors and their levels employed in 2^{5-1} fractional factorial design for amino functionalization of the MWCNT procedure.</i>	72
-----------------	---	----

5. ARTIGO 2

<i>Tabela 1</i>	<i>Experimental factors and their levels employed in 2^{4-1} fractional factorial design for poly-o-ABA-modified electrode.</i>	77
<i>Tabela 2</i>	<i>cTnT concentrations (ng mL^{-1}) from human serum samples by ECLIA and immunosensor methods.</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac	Anticorpo
AFM	" <i>Atomic force microscopy</i> " - Microscopia de força atômica
Ag	Antígeno
CK	" <i>Chreatine kinase</i> " - creatinafosfoquinase
CK-MB	" <i>Chreatine kinase-myocardial band</i> " - fração miocárdica da creatinafosfoquinase
CNT	" <i>Carbon nanotube</i> " - nanotubo de carbono
DMF	Dimetilformamida
E	Potencial
ECLIA	" <i>Electro-chemiluminescence Immunossay</i> " - imunoensaio eletroquimioluminescente
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDA	Etilenodiamina
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EI	Eletrodo impresso
ELISA	" <i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i> " - ensaio imunoenzimático
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
FTIR	" <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> " - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
I	Corrente
I _{pa}	Corrente de pico anódico
I _{pc}	Corrente de pico catódico
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
LDH	" <i>lactate dehydrogenase</i> " - desidrogenase lactato

MWCNT	<i>"Multi walled carbon nanotube"</i> - Nanotubo de carbono de múltiplas paredes
NHS	N-hidroxi succinimida
NTC	Nanotubo de carbono
NTCPMs	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas
NTCPSs	Nanotubo de carbono de paredes simples
PBS	<i>"Phosphate buffer solution"</i> - solução tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>o</i> -ABA	<i>"o-aminobenzoic acid"</i> – ácido <i>o</i> -aminobenzóico
QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i> – microbalança de cristal de quartzo
SCA	Síndrome coronariana aguda
SPE	<i>"Screen-printed electrode"</i> - eletrodo impresso
SPCE	<i>"Screen-printed carbon electrode"</i> - eletrodo impresso de carbono
SPR	<i>"Surface Plasmon Resonance"</i> - ressonância de plásmons em superfície
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TnT	Troponina T
TnI	Troponina I
TnC	Troponina C
V	Velocidade de varredura
VC	Voltamograma cíclico
Vc	Voltametria cíclica
ΔI	Variações de corrente de pico

1. INTRODUÇÃO

As síndromes coronarianas agudas são consideradas atualmente um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsáveis por 29% das mortes registradas em 2007. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que até 2015 as síndromes coronarianas agudas podem se tornar a principal causa de morte de países em desenvolvimento (OMS, 2012). Entre as diversas manifestações clínicas que compreendem as síndromes coronarianas agudas, o infarto agudo do miocárdio (IAM) tem se destacado como principal causa de hospitalização e atendimento em emergências cardiológicas.

O IAM é causado pela interrupção de fluxo sanguíneo nas artérias coronárias. O diagnóstico precoce é fator fundamental para a redução da mortalidade e das possíveis seqüelas para o paciente (MANSUR et al., 2006). Visto que a demora na confirmação do diagnóstico do infarto pode aumentar os riscos de complicações associadas à condição e o atraso para descartar o infarto pode contribuir para superlotação das emergências hospitalares, resultando em maiores custos para os sistemas de saúde. A elevação dos marcadores cardíacos associada às alterações eletrocardiográficas, é um dos fatores fundamentais para estratificação do risco e prognóstico do paciente.

As troponinas cardíacas T (TnT) e I (TnI) são consideradas, dentre os marcadores cardíacos, “padrões-ouro” para a identificação de eventos isquêmicos do miocárdio (ACHAR, KUNDU & NORCROSS, 2005). As troponinas são extremamente importantes na prática clínica, facilitando o diagnóstico e melhorando a avaliação do miocárdio após procedimentos cirúrgicos. De acordo com a cinética de liberação, os níveis séricos das TnT e TnI podem ser mensurados após 2 a 4 horas do início dos sintomas clínicos do infarto e continuam elevados

por cerca de 4 a 7 dias para a TnI, e 10 a 14 dias para a TnT (HERKNER et al., 2001; SARKO & POLLACK, 2002).

Na determinação da TnT ou TnI, são empregados imunoensaios enzimáticos por serem métodos de análise precisos, quantitativos e se basearem na determinação de um produto colorido enzimático obtido de uma reação entre antígenos e anticorpos específicos (STIEGLER et al., 2000). Apesar de convencionalmente empregadas, são técnicas caras que envolvem presença de pessoal qualificado e demandam tempo. Uma das alternativas para estes problemas é o desenvolvimento de biossensores (KRISHNAMOORTHY et al., 2006; ZHANG, MULLENS & GORSKI, 2006).

Os imunossensores, biossensores baseados na reação imunológica, fazem a detecção por meio da interação antígeno-anticorpo, acarretando em um ensaio com elevada especificidade e sensibilidade (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002). Os imunossensores permitem o diagnóstico rápido e por serem portáteis quando comerciais, podem ser usados pelos sistemas de saúde, em ambulatorios e emergências hospitalares. Com isso, poderiam reduzir os custos com internamento hospitalar e aumentar a velocidade no atendimento de urgência, melhorando o prognóstico por IAM.

No intuito de desenvolver outras tecnologias para diagnóstico do IAM, os imunossensores eletroquímicos são considerados como importantes ferramentas analíticas, devido a sua compatibilidade com as tecnologias de miniaturização e capacidade de produção em massa (LOJOU & BIANCO, 2006). A investigação do uso de nanomateriais que permitam aumentar a área eletroativa e a sensibilidade destes dispositivos, tem sido realizada. Diversos tipos de nanomateriais, incluindo nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e micropartículas poliméricas estão sendo utilizadas (LIU & LIN, 2007). Esses materiais promovem o aumento da transferência de elétrons e diminuem o potencial de trabalho do

sensor, podendo consequentemente contribuir para uma estabilidade do elemento biológico, que os tornam potencialmente úteis para aplicação em sensores eletroquímicos (JUBETE et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Desenvolver imunossensores eletroquímicos baseados em eletrodos de carbono para detecção da TnT cardíaca humana.

2.2. *Objetivos específicos*

- Desenvolver plataforma sensora empregando NTCs funcionalizados com etilenodiamina em eletrodos impressos, visando aplicação em ensaios eletroquímicos;
- Modificar a superfície dos eletrodos de carbono vítreo através de filmes poliméricos permitindo que a superfície eletródica disponibilize grupamentos funcionais para ligar anticorpos anti-TnT;
- Realizar um estudo fatorial detalhado;
- Otimizar os parâmetros cinéticos experimentais para determinação da TnT, tais como, pH, concentração do eletrólito, concentração de anticorpo, visando o aumento do desempenho analítico do imunossensor;
- Realizar análises por técnicas eletroquímicas, FT-IR e microscopia eletrônica de varredura para caracterização eletroquímica, estrutural e morfológica dos imunossensores propostos;
- Imobilizar os anticorpos anti-TnT nas plataformas sensoras;
- Realizar estudos de reprodutibilidade e estabilidade das medidas eletroquímicas dos imunossensores propostos;
- Avaliar as respostas dos imunossensores frente às amostras de TnT;
- Obter curvas de calibração dos imunossensores propostos com amostras de soro humano para detecção de TnT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

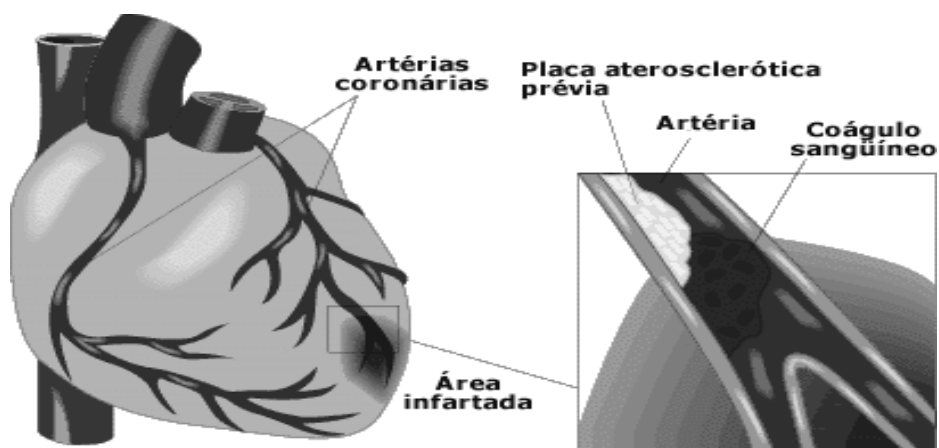
3.1. *Infarto Agudo do Miocárdio - IAM*

Síndrome coronariana aguda (SCA) é o termo designado a um amplo espectro de manifestações clínicas causadas pela isquemia do músculo cardíaco (BERTON & PALATINI, 2003). As SCA são consideradas um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsáveis por 29% das mortes registradas em 2007. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que até 2015 as SCA podem se tornar a principal causa de morte de países em desenvolvimento (OMS, 2012). Entre as diversas manifestações clínicas que compreendem estas síndromes, o IAM tem se destacado como principal causa de hospitalização e atendimento em emergências cardiológicas. A rápida progressão do IAM é um dos principais fatores que corroboram para sua mortalidade (ALPERT et al., 2000).

O IAM ocorre quando há a morte do músculo cardíaco, resultante da oferta inadequada de oxigênio para o coração. Geralmente isso decorre da interrupção abrupta do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, que são vasos sanguíneos que transportam sangue para o músculo cardíaco (**Figura 1**) (BASSAN et al., 2002). O IAM ocorre focalmente em regiões inespecíficas do coração, porém existe uma maior incidência no ventrículo esquerdo e no septo interventricular (LOPES, 2006).

Figura 1. Infarto do miocárdio após a oclusão de um ramo da artéria coronária esquerda.

(Fonte: ANDERSON et al., 2007).



O sintoma mais importante e típico do IAM é a dor ou desconforto intenso retroesternal que é muitas vezes referida como aperto, opressão, peso ou queimação, podendo irradiar-se para pescoço, mandíbula, membros superiores e dorso. Frequentemente, esses sintomas são acompanhados por náuseas, vômitos, sudorese, palidez e sensação de morte iminente (PESARO, SERRANO JR. & NICOLAU, 2004). A duração é caracteristicamente superior a 20 minutos. Dor com as características típicas, mas com duração inferior a 20 minutos sugere angina do peito, onde ainda não ocorreu a morte do músculo cardíaco (STEG et al., 2002).

O IAM, em muitos casos, não apresenta sintomatologia, aparece de forma silenciosa. Um infarto silencioso só será identificado na fase aguda se, por coincidência, um eletrocardiograma ou uma dosagem de marcador cardíaco for realizada enquanto ele ocorre. Os achados dependerão da extensão do infarto. Na maioria das vezes os pacientes apresentam-se desconfortáveis, ansiosos e com sinais de liberação adrenérgica (BASSAN et al., 2002).

O IAM resulta da aterosclerose, ou seja, a deposição de placas de gordura nas paredes das artérias coronárias, que leva à formação de um coágulo, responsável pela interrupção do fluxo sanguíneo. A aterosclerose tem seu desenvolvimento acelerado pelos chamados fatores de risco cardiovascular. Entre eles, os mais importantes são a idade (homens a partir dos 55 anos, mulheres após os 60 anos), diabetes, tabagismo, hipertensão arterial, altos níveis sanguíneos de colesterol, histórico familiar de IAM, obesidade e sedentarismo (ANTMAN et al., 2008). O IAM pode ter outras causas, tais como o uso de álcool ou drogas ilícitas, aneurisma da artéria coronária, doenças da aorta e doenças inflamatórias das artérias coronárias. Porém, essas condições são mais raras (BASSAN et al., 2002).

O eletrocardiograma é um método diagnóstico bastante utilizado na avaliação inicial das dores precordiais. O registro eletrocardiográfico não somente pode estabelecer a relação entre sintoma clínico e diagnóstico das SCA, como também prover informações relevantes para a melhor opção terapêutica e a estratificação prognóstica do paciente. Assim, a análise criteriosa do segmento ST e da onda T do traçado eletrocardiográfico representa um caminho na tomada de decisão sobre como conduzir o raciocínio clínico (HOLMVANG & LUSCHER, 1998).

3.2. Marcadores Cardíacos

Atualmente os marcadores de dano isquêmico são prontamente utilizados na prática clínica, impondo a todo médico que acompanha pacientes com doenças cardíacas, o conhecimento não só das vantagens, mas principalmente, das limitações desses marcadores a fim de que possam ser integrados de maneira adequada à conduta clínica (MOSCA, 2002).

A concentração plasmática de um marcador biológico de necrose miocárdica depende do tempo transcorrido desde o início do processo isquêmico, da cinética de sua liberação, do

método analítico utilizado para sua medida e, sobretudo, de sua sensibilidade (LEE & GOLDMAN, 1986). Neste sentido, a primeira determinação do marcador de necrose miocárdica pode ser negativa, e posteriormente, resultar em positiva, justificando com isso a medição seriada de alguns marcadores bioquímicos (SANTALO, GUINDO & ORDONEZ, 2003).

A liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular ocorre através do rompimento da membrana das células cardíacas ocasionadas pelo IAM (MORESCO et al., 2004). Entre os constituintes que são liberados da célula em estado de isquemia e necrose, os que se encontram solubilizados no citoplasma e os de menor massa molecular, são os que mais facilmente ganham a circulação como íons e alguns metabólitos. Com a persistência da isquemia, macromoléculas citoplasmáticas das células lesionadas são liberadas no sangue, o qual é fruto do comprometimento das membranas celulares dos cardiomiócitos (MORROW et al., 2007).

Aspartato aminotransferase, antes denominada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), está presente nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas, nos parênquimas hepático, pancreático e renal, nos eritrócitos e no sistema nervoso central. A referência a esta enzima possui caráter histórico por ter sido a primeira utilizada para diagnóstico de pacientes com IAM. Seu uso com esta finalidade foi abandonado em razão do surgimento de outros marcadores mais sensíveis e mais específicos (MOTTA, 2003).

A desidrogenase láctica total e isoenzimas ("*lactate dehydrogenase*" - LDH) possui uma ampla distribuição em diferentes tecidos, resultando em baixa especificidade, então a determinação da sua atividade não é mais recomendada para o diagnóstico ou acompanhamento do paciente com lesão cardíaca (MOTTA, 2003).

A creatinafosfoquinase ("*chreatine kinase*" - CK) é uma enzima citoplasmática que apresenta baixa especificidade pelo tecido cardíaco, visto que é encontrada em todos os

músculos estriados e em órgãos como cérebro, pulmão, rins e trato intestinal. Podem encontrar-se em níveis aumentados em eventos não cardíacos como traumas, insuficiência renal, hipertermia e hipertireoidismo (IOANNIDIS, KARVOUNI & KATRITSIS, 2003; ACHAR, KUNDU & NORCROS, 2005).

Os marcadores de injúria cardíaca mais utilizados na clínica médica incluem a mioglobina, a isoenzima da fração miocárdica da CK (“*chreatine kinase mioglobin*”- CK-MB) e as troponinas T e I (TnT e TnI), com cardioespecificidade variável entre elas (ACHAR, KUNDU & NORCROS, 2005).

A determinação da mioglobina no soro pode ser útil para descartar o diagnóstico de IAM, uma vez que possui elevado valor preditivo negativo. Por ser uma proteína presente no citoplasma e de baixo peso molecular, é liberada para a circulação precocemente após lesão isquêmica da fibra miocárdica. Concentrações elevadas são observadas 1 a 2 horas após o início da dor, atingindo o pico em 12 horas e, em geral, normalizando 24 horas (ALPERT et al., 2000; MORROW et al., 2007).

A isoenzima CK-MB possui elevadas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de lesão do músculo cardíaco (ALPERT et al., 2000). Em geral, são realizadas três determinações seriadas num período de 9 a 12 horas. Se as três dosagens estiverem dentro dos intervalos de referência, o diagnóstico de IAM pode ser excluído. Preferencialmente, deve-se realizar a dosagem da massa de proteína correspondente à isoenzima (CK-MB massa) e não da atividade enzimática. A concentração da CK-MB se eleva de 3 a 8 horas após o processo lesivo, atinge um pico em 24 horas e normaliza em 72 a 96 horas após um episódio único e limitado (KARRAS & KANE, 2001). A intensidade da elevação se correlaciona com o volume de tecido lesado e com o prognóstico. O intervalo de referência para a isoenzima CK-MB, avaliada pela massa, é de até $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de soro (ANTMAN et al., 2008).

Nos últimos anos o diagnóstico de IAM baseava-se na existência de no mínimo três critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde: dor torácica com características isquêmicas, alterações eletrocardiográficas sugestivas e aumento sérico da quantidade de massa da CK-MB. No entanto, a sensibilidade da CK-MB não é suficientemente alta para detectar pequeno dano no miocárdio, face à imprecisão analítica das medidas de atividade e à ampla faixa de normalidade (NICOLAU et al., 2007).

Isto levou à procura de outros métodos ou novos marcadores diagnósticos de lesão celular miocárdica, viabilizando a estratificação de risco de eventos coronarianos, o que até então, não era possível com os marcadores tradicionais, permitindo com isso uma melhor abordagem terapêutica (LINDAHL et al., 2000; GRECO, 2005).

As troponinas cardíacas, permitem cobrir uma parte importante das necessidades clínicas tanto na avaliação diagnóstica (HERKNER et al., 2001) e estratificação do risco, como na orientação quanto à terapêutica frente à SCA. Visto que, na ausência de necrose miocárdica aguda ou subaguda, as concentrações das troponinas cardíacas no plasma são indetectáveis. Consequentemente, sua medida é absolutamente cardioespecífica, permitindo reconhecer necrose miocárdica de tamanho reduzido e a existência de IAM até mesmo em pacientes com angina instável, que não seriam reconhecidos utilizando-se outros marcadores (PLEBANI & ZANINOTTO, 1999; HERKNER et al., 2001).

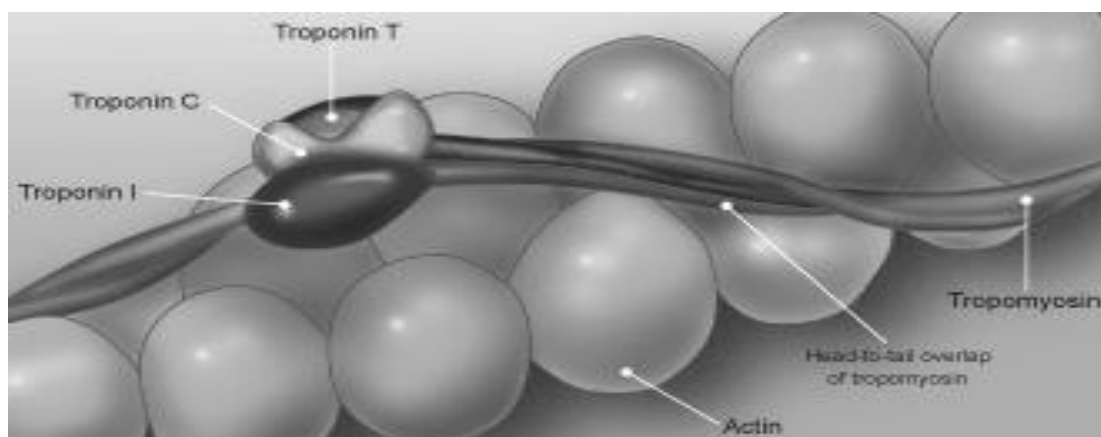
3.2.1. Troponinas

As troponinas têm recebido crescente atenção como marcadores altamente específicos de injúria celular. Troponinas são proteínas estruturais envolvidas no processo de contração das fibras musculares esqueléticas e cardíacas. (BABUIN & JAFFE, 2005). As troponinas formam um complexo que regula a interação cálcio-dependente da miosina com a actina. São constituídas de três diferentes proteínas (troponina C, T e I) existentes no músculo esquelético

e cardíaco e codificadas por diferentes genes (**Figura 2**). A troponina C (TnC) é co-expressa nas fibras musculares esqueléticas de contração lenta e não é considerada como um marcador específico cardíaco (NICOLAU et al., 2007).

Com a redefinição de IAM proposta por um comitê formado em 2000 pela *European Society of Cardiology* e pelo *American College of Cardiology*, as troponinas cardíacas T (TnT) e I (TnI), tem sido recomendadas como marcadores “padrão ouro” para o diagnóstico de IAM (ALPERT et al., 2000). As TnT e TnI apresentam individualmente seqüências de aminoácidos específicas ao miocárdio (COLLINSON & GAZE, 2005), o que permite a confecção de ensaios imunológicos, a partir de anticorpos monoclonais para detecção de necrose do músculo cardíaco com alta especificidade, característica esta não conferida à TnC (ALPERT et al., 2000; ACHAR, KUNDU & NORCROSS, 2005; CAMERON et al., 2007).

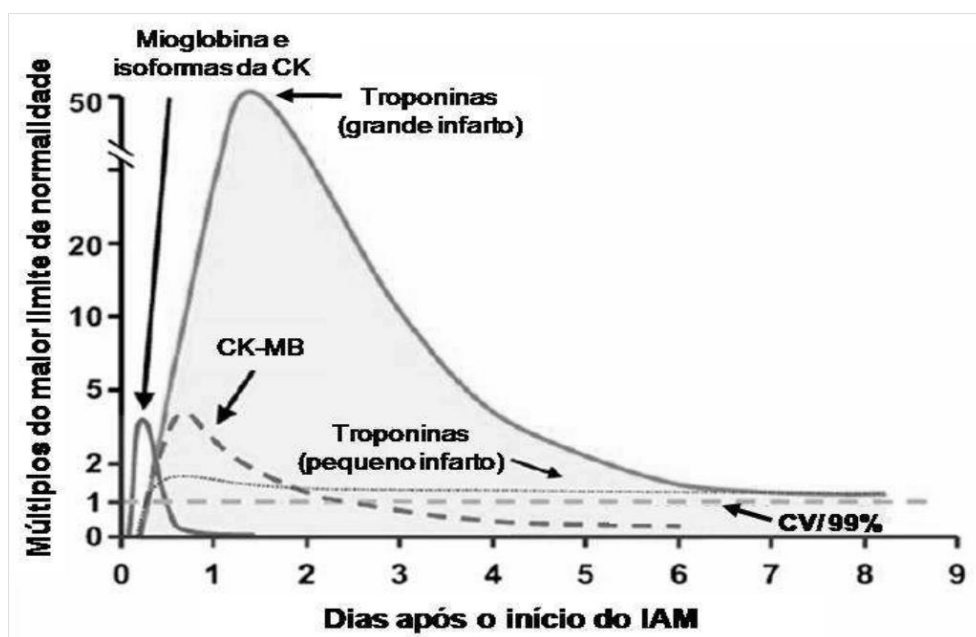
Figura 2. Complexo troponina composto pelas três subunidades: T, C e I. (Fonte: CHAIKHOUNI & AL-ZAIM, 2007).



Estruturalmente, as troponinas cardíacas encontram-se vinculadas ao aparato contrátil miofibrilar, entretanto, aproximadamente 7% da TnT e 3 a 5% da TnI estão livres no citoplasma (WU & FENG, 1998). Após o dano e rompimento da membrana celular dos cardiomiócitos em eventos de necrose, há um aumento bifásico das concentrações de

troponinas no soro que correspondem à liberação inicial das proteínas livres no citoplasma, seguido da gradual dispersão das troponinas ligadas ao complexo miofibrilar. Assim, de acordo com a cinética de liberação, os níveis séricos das TnT e TnI podem ser mensurados após 2 a 4 horas do início dos sintomas clínicos do infarto e manter-se elevados por cerca de 4 a 7 dias para a TnI, e 10 a 14 dias para a TnT (JAFJE, BABUIN & APPLE, 2006; MORROW et al., 2007) (**Figura 3**).

Figura 3. Desempenho dos principais marcadores cardíacos em pacientes com IAM (Fonte: ANDERSON et al., 2007).



Alguns autores atribuem à TnI e TnT a mesma especificidade e importância na avaliação dos danos cardíacos (PENTTILÄ et al., 1999; PLEBANI & ZANINOTTO, 1999). Entretanto, para avaliar a extensão da lesão e tamanho do infarto, os valores de TnT, quando

quantificados entre 72 e 92 horas após o evento isquêmico, fornecem informações mais fidedignas do que a TnI (LICKA et al., 2002; STEEN et al., 2006).

A TnT é uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 36 kDa, cujo gene humano está localizado no braço curto do cromossomo 23. O gene da TnT (TNNT2) é relativamente grande com capacidade de gerar múltiplos transcritos com produção de diferentes isoformas protéicas (**Figura 4**)(PASCALE et al., 2006). Quatro isoformas da TnT (TnT₁₋₄) são expressas no músculo cardíaco humano. Diferentes níveis de expressões dessas isoformas em corações normais e doentes sugerem fortemente que as mesmas são importantes contribuintes para a função vascular do coração, ajudando o coração a se adaptar às mudanças na carga de trabalho (GOMES et al., 2002).

Figura 4. Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene TNNT2 da cTnT humana (Fonte: PASCALE et al., 2006).

Sequência de nucleotídeos (867 nucleotídeos):

```
ATGTCTGACATAGAAGAGGTGGTGGAAAGTACGAGGAGGAGGAGCAGGAAGAAGCAGCTGTTGAAGAGC
AGGAGGAGGCAGCGGAAGAGGATGCTGAAGCAGAGGCTGAGACCGAGGAGACCAGGGCAGAAGAAGATGA
AGAAGAAGAGGAAGCAAAGGAGGCTGAAGATGGCCCCAATGGAGGAGTCCAAACCAAAGCCAGGTCGTTT
ATGCCCCAATTGGTGCCTCCCAAGATCCCCGATGGAGAGAGAGTGGACTTTGATGACATCCACCGGAAGC
GCATGGAGAAGGACCTGAATGAGTTGCAGGCCTGATCGAGGCTCACTTTGAGAACAGGAAGAAAGAGGA
GGAGGAGCTCGTTTTCTCTCAAAGACAGGATCGAGAGACGTCGGGCAGAGCGGGCCGAGCAGCAGCGCATC
CGGAATGAGCGGGAGAAGGAGCGGCAGAACCGCCTGGCTGAAGAGAGGGCTCGACGAGAGGAGGAGAGA
ACAGGAGGAAGGCTGAGGATGAGGCCCGGAAGAAGAAGGCTTTGTCCAACATGATGCATTTTGGGGTTA
CATCCAGAAGCAGGCCAGACAGAGCGGAAAAGTGGGAAGAGGCAGACTGAGCGGAAAAGAAGAAGAAG
ATTCTGGCTGAGAGGAGGAAGGTGCTGGCCATTGACCACCTGAATGAAGATCAGCTGAGGGAGAAGGCCA
AGGAGCTGTGGCAGAGCATCTATAACTTGGAGGCAGAGAAGTTGACCTGCAGGAGAAGTTCAAGCAGCA
GAAATATGAGATCAATGTTCTCCGAAACAGGATCAACGATAACCAGAAAGTCTCCAAGACCCGCGGGAAG
GCTAAAGTCACCGGGCGCTGGAAATAG
```

Sequência de aminoácidos traduzidos (288 aminoácidos):

```
MSDIEEVVEEYEEEEQEEAAVEEQEEAAEEDAEAEAEETEETRAEEDEEEEAKEAEDGPMEESKPKPRSF
MPNLVPPKIPDGERVDFDDIHRKRMEKDLNELQALIEAHFENRKKEEELVSLKDRIERRRAERAEQQRI
RNEREKERQNLAEERARREEENRRKAEDEARKKKALSNMMHFGGYIQKQAQTERKSGKRQTEREKKKK
ILAERRKVLAIIDLHNLNEDQLREKAKELWQSIYNLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLNRINDNQKVSKEGRGK
AKVTGRWK
```

A introdução da dosagem de TnT na prática clínica tem facilitado enormemente o diagnóstico e avaliação do grau de dano miocárdico (DAUBERT & JEREMIAS, 2010). Diversos imunoensaios têm sido atualmente disponibilizados no mercado para dosagem da TnT, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra sítios antigênicos específicos.

Imunoensaios enzimáticos (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tipo "sanduíche", foram inicialmente descritos por KATUS e colaboradores (1989) para detecção da TnT, o Cardiac T Enzymun- Test® (Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha). Anticorpos monoclonais anti-TnT conjugados à enzima peroxidase foram utilizados nestes ensaios para detecção quantitativa da interação antígeno-anticorpo.

Outros imunoensaios empregam reações de eletroquimioluminescência (ECLIA, do inglês, *Electrochemiluminescence Immunossay*) para dosagem da TnT, como o teste Elecsys® Troponin T STAT (Roche Diagnostics Mannheim, Alemanha). O princípio da técnica consiste na determinação de imunocomplexos, através da luminescência produzida por anticorpos monoclonais anti-TnT conjugados ao rutênio (TATE & PANTEGHINI, 2008). Estes métodos convencionais para diagnóstico da TnT requerem profissionais qualificados, diversas etapas bioquímicas e equipamentos relativamente caros (GILL, BEAVEN & COOK, 2006).

Sistemas mais práticos e portáteis para determinação da cTnT tem sido desenvolvidos empregando testes imunocromatográficos, tais como o Cardiac Reader® (Roche Diagnostics Mannheim, Alemanha). Este método baseia-se na interação da cTnT circulante na amostra do paciente com anticorpos anti-TnT conjugados a partículas de ouro coloidal em uma membrana de nitrocelulose (CHRISTENSON & AZZAZY, 2009). Entretanto, os ensaios imunocromatográficos apresentam apenas informações qualitativas, impossibilitando inferir sobre o dano e a extensão da lesão cardíaca. Portanto, faz-se necessário o incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico do IAM, com o objetivo de

diminuir o tempo de execução e os custos do ensaio, sem perder a especificidade e a sensibilidade dos métodos convencionais. Além disso, essas novas tecnologias podem permitir a realização do exame no próprio ambulatório ou até mesmo em unidades móveis de emergência.

3.3 Biossensores

O primeiro biossensor, demonstrado por CLARK & LYONS (1962), foi produzido para determinação da glicose. A tecnologia desse trabalho foi transferida e desenvolvida pela *Yellow Spring Instrument Company* levando ao lançamento comercial do primeiro biossensor de glicose em 1975 (YELLOW SPRING INSTRUMENT COMPANY, 2012). Desde então, várias formas de biossensores para glicose foram desenvolvidas (RICCI & PALLESCHI, 2005), assim como muitas outras tecnologias de dispositivos (ARYA, DATTA & MALHOTRA, 2008).

O mercado de biossensores é bastante promissor, foram contabilizados investimentos em 2009 de aproximadamente 13 bilhões de dólares e até 2016 os investimentos estão projetados para ultrapassarem os 14 bilhões (**Figura 5**) (TANG, 2010; THUSU, 2010). Na área acadêmica, em 2009, as publicações envolvendo biossensores ultrapassaram os 6.000 artigos. As previsões até 2016 sugerem que esta tendência de crescimento irá continuar com destaque para os biossensores do tipo *point-of-care* (**Figura 6**) (THUSU, 2010).

Figura 5. Previsão da receita mundial de 2009-2016 em relação aos biossensores (Fonte: THUSU, 2010).

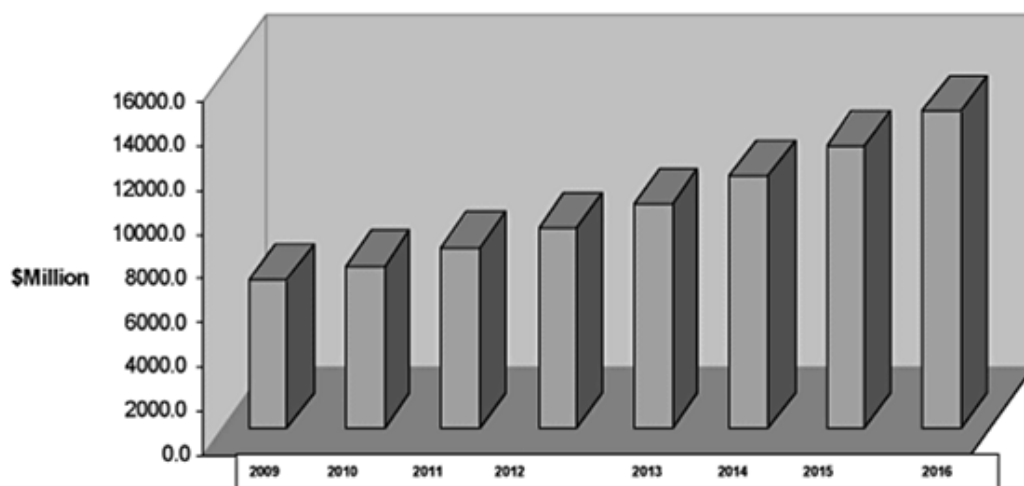
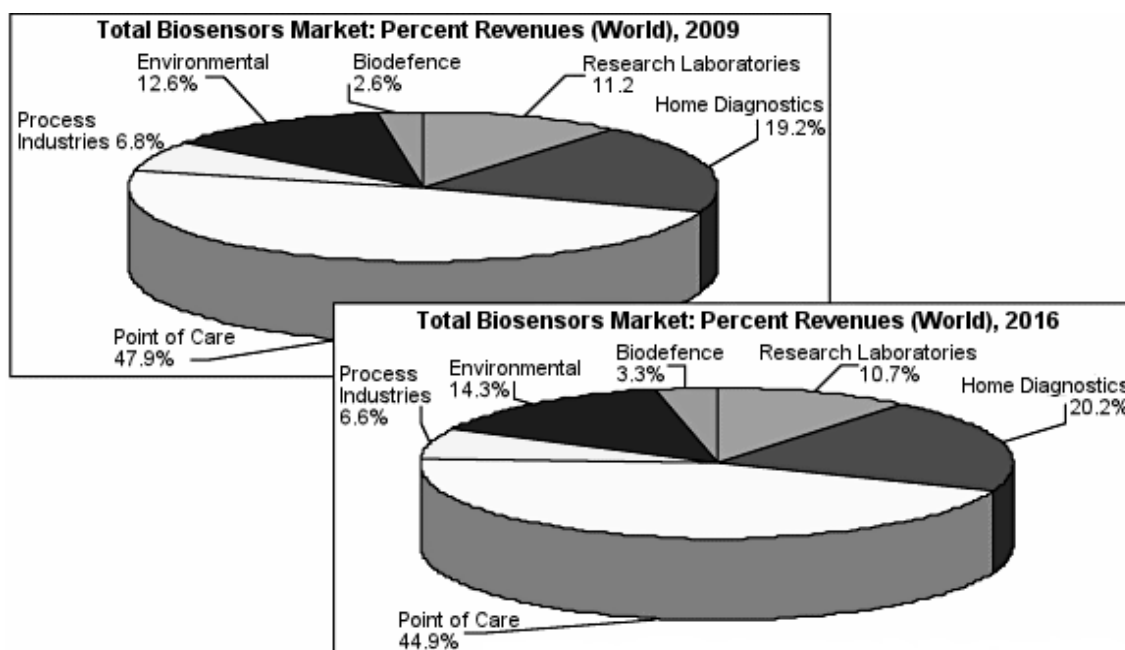
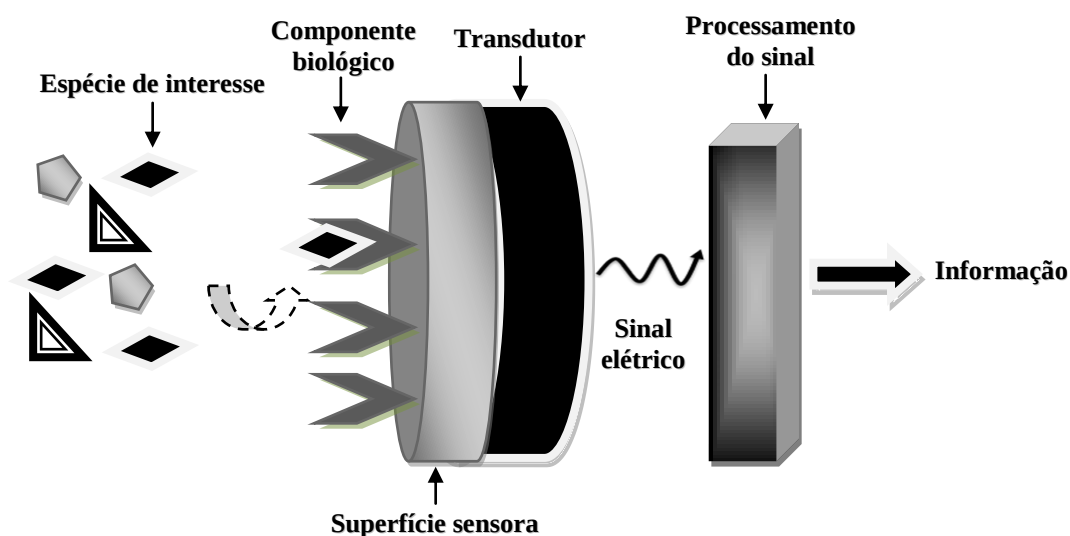


Figura 6. Percentuais do mercado mundial dos biossensores em 2009 e 2016 (Fonte: THUSU, 2010).



De acordo com a definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), biossensores, por definição, são dispositivos que têm a propriedade de detectar uma espécie química ou biológica (analito), quali ou quantitativamente (ROSATTO et al., 2001), sendo composto por um elemento biológico e um transdutor (**Figura 7**). O elemento biológico tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A resposta bioquímica desta interação, então, é convertida pelo transdutor num sinal passível de ser quantificado (LOUZADA, LUCCAS & MAGALHÃES, 2004; FERREIRA & YAMANAKA, 2006).

Figura 7. Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor.



Atualmente, a tecnologia dos biossensores tem sido desenvolvida para detecção de importantes biomoléculas com o objetivo de fornecer informações rápidas e precisas sobre amostras de interesse. Assim, estes dispositivos surgem como uma importante ferramenta analítica no campo da medicina, agricultura, segurança alimentar, bioprocessamento, monitoramento industrial e ambiental (LUONG, MALE & GLENNON, 2008).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento e reconhecimento biológico e o tipo de transdutor empregado (LUONG, MALE & GLENNON, 2008). Os principais materiais biológicos utilizados nestes dispositivos são proteínas, enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos. Além destes, microrganismos, células animais e vegetais e cortes de tecidos também podem ser usados (VELASCO-GARCIA, 2009). Em relação ao sistema de reconhecimento biológico os biossensores podem ser classificados em duas categorias: os biossensores biocatalíticos e os biossensores por bioafinidade (AIZAWA, 1991).

O biossensor biocatalítico é baseado em elementos que favorecem a ocorrência de reações químicas a partir de um ou mais substratos, havendo a formação de um ou mais produtos, sem o consumo do biocatalisador, que pode ser regenerado e reutilizado (MARAZUELA & MORENO-BONDI, 2002). Os tipos de biocatalisadores comumente utilizados são as enzimas, células e tecidos.

O biossensor por afinidade, de outra forma, envolve anticorpos e/ou antígenos, ligação protéica ou receptor protéico, o qual forma um composto complexo com o correspondente ligante. Este complexo é estável o bastante para resultar em um sinal de transdução. Quando o reconhecimento da molécula de interesse é dado pela formação de imunocomplexos, este biossensor recebe o nome de imunossensor (LUPPA et al., 2001). Os imunossensores resultam em respostas altamente seletivas, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a alta especificidade (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002).

De acordo com o envolvimento de marcadores conjugados aos imunoreagentes, os imunossensores podem ser classificados como marcados e não-marcados (*“label-free”*). A maioria dos imunossensores marcados descritos na literatura exploram o princípio dos imunoenaios tipo competitivo e sanduíche utilizando enzimas, fluoróforos e nanopartículas

como marcadores. Apesar de seletivos, este método implica em elevados custos operacionais, incluindo aumento das etapas de processamento da amostra (RAPP, GRUHL & LÄNGE, 2010).

Nos ensaios “*label-free*” a resposta do imunossensor é obtida diretamente após o evento de bioreconhecimento. Neste tipo de ensaio, a interação antígeno-anticorpo na superfície sensora pode ser obtida através do monitoramento de mudanças físicas, tais como o índice de refração em sistemas em transdutores ópticos empregando a técnica de ressonância de plasmons de superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*) (ABDULHALIM, ZOUROB & LAKHTAKIA, 2008), alterações de massa, em transdutores piezoelétricos utilizando a microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês, *Quartz Crystal Microbalance*) (LIU et al., 2004), e propriedades elétricas em transdutores eletroquímicos (BACKMAN et al., 2005).

No sistema SPR, ondas eletromagnéticas longitudinais aplicadas entre um metal e um dielétrico são exploradas para analisar a interação antígeno-anticorpo através de alterações das propriedades ópticas, tais como o índice de refração. Os sistemas Biacore[®], imunossensores do tipo SPR, são protótipos de sensores para a detecção de TnT cardíaca humana bem conhecidos e comercializados (VAISOCHEROVÁ et al., 2009). Os trabalhos citados na literatura alcançaram ótimos resultados e diferem entre si, basicamente, quanto às técnicas de imobilização do anti-TnT sobre a superfície eletródica, quanto à sensibilidade e à possibilidade de amplificação dos sinais (DUTRA et al., 2007; DUTRA & KUBOTA, 2007). No entanto, a tecnologia SPR, apesar da alta sensibilidade para detecção “*label-free*” de analitos de baixos pesos moleculares, não possibilita o desenvolvimento de sensores mais simplificados, miniaturizados e, por consequência, de baixo custo, devido ao alto grau de complexidade do sistema descrito (SHIAU, MASSARI & OZBAL, 2008).

Os transdutores piezoelétricos têm como princípio analítico o monitoramento da formação de imunocomplexos através de variações da frequência de oscilação de um cristal em estado vibracional (LIU et al., 2004). Comparado aos transdutores ópticos, existem publicações mais recentes na área de imunossensores piezoelétricos para detecção de TnT, diferindo do tipo de modificação eletródica utilizada e limites de detecção (WONG-EK et al., 2010; MATTOS et al., 2012), entretanto a dificuldade para miniaturização é uma das principais limitações para a elaboração de ensaios portáteis (JANSHOFF & STEINEM, 2005).

Dentro desse contexto, os transdutores eletroquímicos têm se destacado no desenvolvimento de imunossensores para clínica médica, devido a sua alta sensibilidade, baixo custo e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação (QIU et al., 2009; ZHANG et al., 2009; LI, YANG & LI, 2011). As pesquisas na linha de imunossensores eletroquímicos para TnT está em crescimento, pois, nestes sistemas, alterações na distribuição de cargas na interface sensora através de medidas de capacitância, impedância, condutância e potencial são utilizadas para o monitoramento em tempo real da reação antígeno-anticorpo (VASCONCELOS et al., 2009; SILVA et al., 2010; GOMES-FILHO et al., 2013; MATTOS et al., 2013; SILVA et al., 2013).

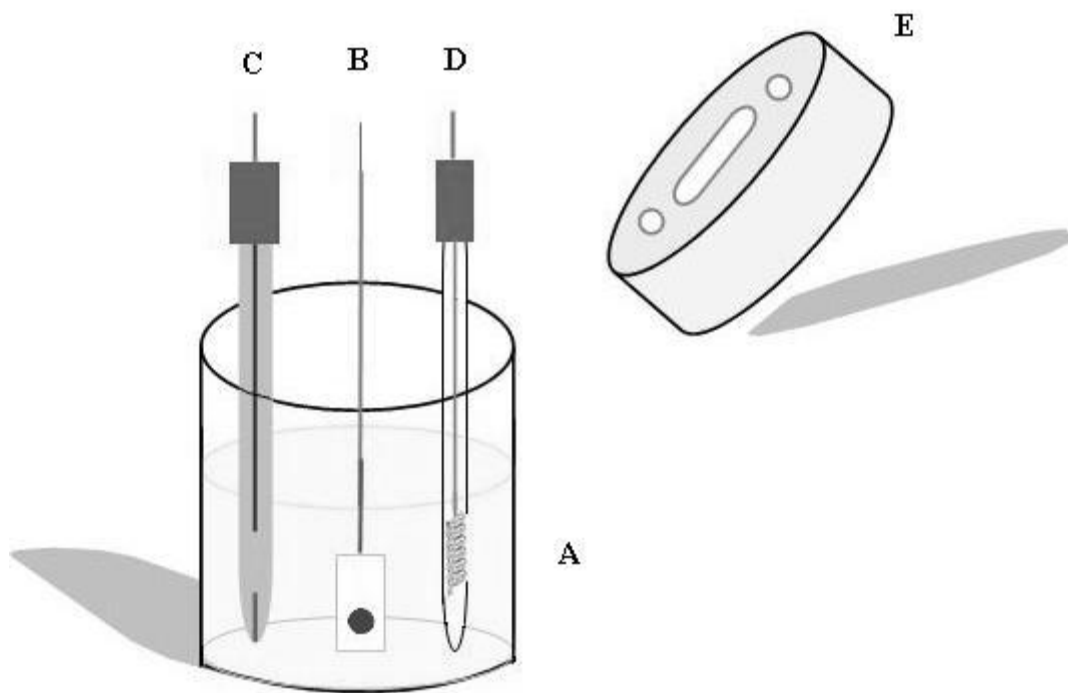
O transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias presentes na amostra a ser analisada. A escolha de um determinado transdutor não depende apenas do elemento de reconhecimento selecionado, já que este determina quais variações das propriedades físico-químicas ocorreriam em função da interação, mas depende também de outros fatores como tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002).

3.3.1 Imunossensores Eletroquímicos

Imunossensores eletroquímicos têm como princípio básico a detecção de espécies eletroativas consumidas e/ou geradas durante o processo de interação do elemento biológico com seu substrato específico (MEHRVAR & ABDI, 2004). Esses sensores são projetados através do acoplamento de moléculas biológicas à superfície eletródica, que respondem ao aplicar impulsos elétricos, tais como corrente (I) ou potencial (E) (SADIK, ALUOCH & ZHOU, 2009).

Em geral, os sistemas eletroquímicos são constituídos por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (prata/cloreto de prata - Ag/AgCl ou calomelano saturado - $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$) e um eletrodo auxiliar (fio de platina) (**Figura 8**). Esses eletrodos são conectados a um potenciostato e imersos em uma célula contendo a solução da espécie eletroativa de interesse com um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte) responsável por garantir o controle difusional das espécies (GANDRA et. al., 2004). O eletrodo de referência mantém o potencial de trabalho estável, necessitando ter um potencial que seja estável com o tempo e temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, pela passagem de uma pequena corrente. O eletrodo auxiliar estabelece uma conexão com a solução eletrolítica, enquanto o eletrodo de trabalho funciona como elemento transdutor da reação bioquímica podendo ser este de ouro, prata, platina, diamante ou a base de carbono, grafite ou condutores (GRIESHABER et al., 2008).

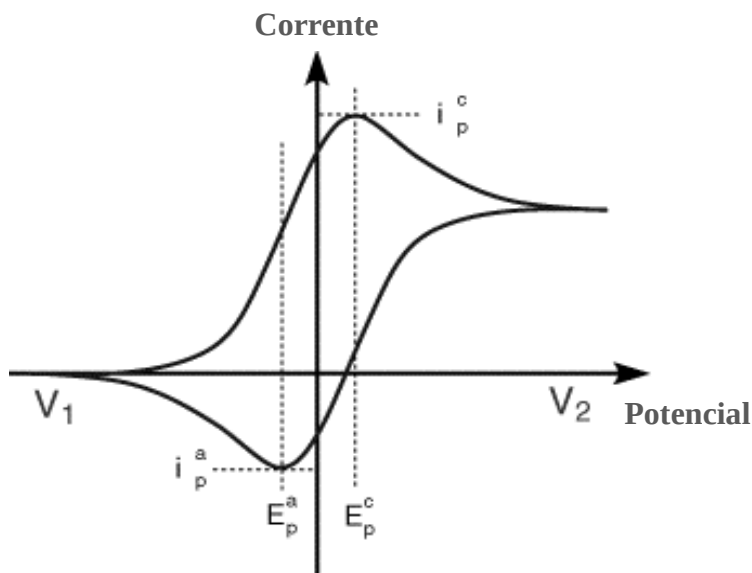
Figura 8. Desenho esquemático de um sistema eletroquímico com três eletrodos. **(A)** célula eletroquímica de vidro; **(B)** eletrodo de trabalho; **(C)** eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl saturado); **(D)** eletrodo auxiliar helicoidal de fio de platina e **(E)** tampa de PVC com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções.



Imunossensores eletroquímicos amperométricos constituem-se em dispositivos mantidos em potencial fixo, que propiciam sinais de corrente faradáica em função de processos eletródicos que ocorrem na interface eletrodo/solução (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006). A corrente faradáica gerada é produzida pela reação redox de espécies eletroativas na superfície sensora, sendo diretamente proporcional à concentração do analito (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002). Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

Em relação às técnicas amperométricas empregadas, destaca-se a voltametria cíclica (Vc), que estuda a transferência de elétrons entre as moléculas e a superfície eletródica a partir do registro de curvas corrente x potencial (GANDRA et al., 2004). A Vc é uma das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A resposta em corrente neste método pode ser obtida quando o eletrodo de trabalho é submetido a uma onda triangular de potencial, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Como resultado, é gerado um gráfico de corrente em função da variação do potencial, denominado voltamograma cíclico VC) (**Figura 9**). Os principais parâmetros analisados num voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons. Para uma reação reversível, as I_{pa} e I_{pc} são aproximadamente iguais em valor absoluto, a diferença entre os E_p é aproximadamente 59 mV e E_p é independente da velocidade de varredura. Já em sistemas irreversíveis observa-se uma completa ausência de picos de oxido-redução reversos e deslocamentos do E_p em relação à velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

Figura 9. Representação gráfica de um típico voltamograma cíclico obtido pela técnica de VC. (Fonte: UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, 2011).



Os testes diagnósticos para a caracterização dos processos são geralmente descritos de acordo com a própria feição do voltamograma. A dependência do potencial e da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, com análise baseada nos testes diagnósticos, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons, a presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (LOJOU & BIANCO, 2006).

3.4. Eletrodos impressos

O desenvolvimento de plataformas sensoras mais recentes tem considerado a importância de oferecerem procedimentos mais simplificados e adaptações quanto ao tamanho e arranjo dos dispositivos, facilitando a análise de campo ou coleta do analito de

interesse no eletrodo para posterior análise. A miniaturização destes dispositivos tem como objetivo aumentar o rendimento e automação dos ensaios, reduzindo o custo do diagnóstico, consequentemente fornecendo uma economia expressiva para os ensaios repetitivos realizados em laboratórios (TSOUTI et al., 2011).

Neste contexto, o desenvolvimento da tecnologia de eletrodos impressos (EIs) tem atendido a demanda deste mercado oferecendo um completo sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia (BERGAMINI, OLIVEIRA & ZANONI, 2005; METTERS, KADARA & BANKS, 2011). A tecnologia de EIs tem sido adaptada à indústria permitindo uma fácil produção em massa de eletrodos portáteis e descartáveis. O potencial destes dispositivos para aplicação comercial pode ser demonstrado atualmente através dos *tips* sensores utilizados para determinação da glicemia de indivíduos diabéticos empregando glicosímetros (METTERS, KADARA & BANKS, 2011).

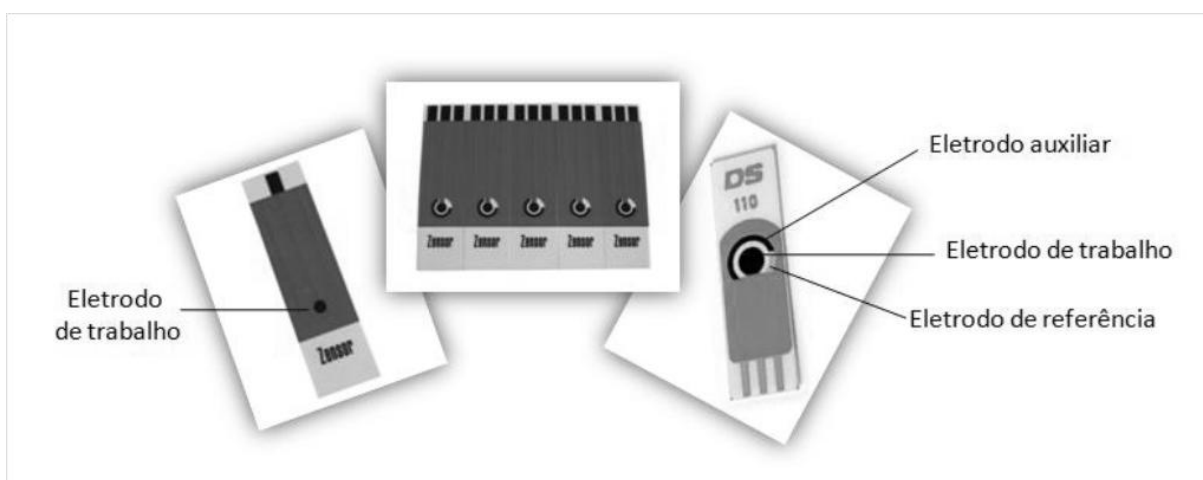
O processo de confecção dos EIs é baseado na impressão de finos filmes compósitos sobre substratos inertes. A impressão do filme é feita através de um molde em contato com o substrato. Os substratos mais utilizados para confecção dos EIs são materiais de cerâmica e à base de plástico (FANJUL-BOLADO et al., 2008). Os EIs podem ser facilmente modificados através da adição de materiais funcionais à matriz de impressão, tais como mediadores, moléculas biológicas, nanomateriais, etc, ou através da modificação direta da interface sensora (CAI et al., 2009).

Entre as principais vantagens oferecidas pela tecnologia de EIs podem ser destacadas: a flexibilidade no design do sensor, a diversidade de materiais de impressão, portabilidade, fácil integração com circuitos eletrônicos, automação no processo de confecção, produção em massa e baixo custo (METTERS, KADARA & BANKS, 2011).

A possibilidade de automação, através da confecção de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência impressos no mesmo suporte, torna os EIs

extremamente atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores comerciais (**Figura 10**).

Figura 10. *EIs disponíveis no mercado desenvolvidos em diferentes configurações (FONTE: DROPSSENS, 2012; ZENZOR, 2012).*



Tintas de carbono ou metálicas (platina, ouro e prata) têm sido comumente utilizadas como filme condutor na fabricação de EIs. Em particular, as tintas de carbono têm se destacado, devido às suas características atrativas, tais como ampla janela de potencial, boa condutividade elétrica, estabilidade, baixa corrente residual e baixo custo (USLU & OZKAN, 2007; ZHANG et al., 2011). Tintas de carbono, em geral, são compostas por partículas de grafite, polímeros aglutinantes e outros aditivos. Diferenças na composição das tintas (tipo, tamanho e carga das partículas de grafite), impressão, condições de cura e pré-tratamentos podem afetar a transferência de elétrons e o desempenho analítico dos EIs (GORNALL, COLLYER & HIGSON, 2009). Estudos realizados por ZHANG e colaboradores (2011) têm demonstrado que a composição e a preparação dos eletrodos utilizando diferentes tintas

comerciais de carbono têm profunda influência sobre o comportamento eletroquímico dos sensores impressos.

3.5. Modificação Eletródica

Um dos grandes desafios para a construção de imunossensores mais sensíveis e confiáveis é a imobilização das biomoléculas sobre as superfícies condutoras (FREIRE, DURAN & KUBOTA, 2001; WANG et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas de modificação da superfície eletródica tem sido importante por aumentar a estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor.

Na modificação eletródica, a superfície do eletrodo pode ser propositadamente alterada por adsorção irreversível direta, por ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, por recobrimento com filmes poliméricos e nanomateriais, ou, ainda, na preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água para a sua adsorção neste tipo de substrato. (PEREIRA, SANTOS & KUBOTA, 2002).

A modificação da interface de imunossensores com nano e micromateriais tem se tornado uma importante ferramenta para o aperfeiçoamento desses dispositivos (LUO, MORRIN & KILLARD, 2006). Têm sido utilizados diversos tipos de nanomateriais, incluindo nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e micropartículas poliméricas (LIU & LIN, 2007). Esses materiais podem promover o aumento da área reativa, aumentam a transferência de elétrons, diminuem o potencial de trabalho do sensor, podendo conseqüentemente contribuir para uma maior estabilidade do elemento biológico (JUBETE et al., 2009).

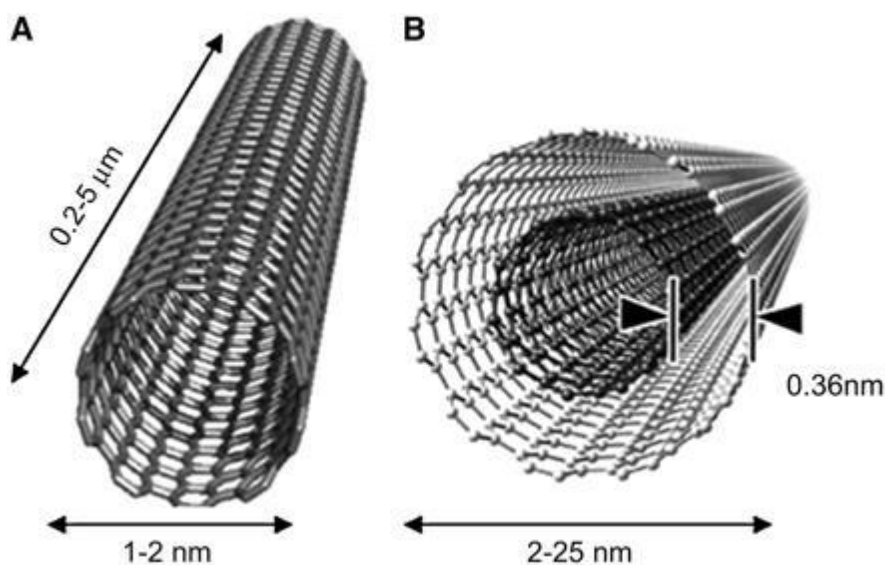
As micro/nanopartículas e os nanotubos de carbono são os mais utilizados na modificação eletródica de imunossensores. Do ponto de vista tecnológico, esses materiais

podem ter suas superfícies modificadas com moléculas de interesse ou polímeros, fato esse que amplia imensamente suas aplicações.

3.5.1. Nanotubos de carbono (NTCs)

Descritos pela primeira vez por Sumio Iijima, em 1991, os NTCs são formados por arranjos hexagonais de carbono, com hibridização sp^2 , dispostos em folhas de grafeno em formato cilíndrico. Esses materiais podem ser constituídos por uma única folha de grafeno, referido como NTCs de parede simples (NTCPSs), ou múltiplas camadas concêntricas de grafeno, formando estruturas conhecidas como NTCs de paredes múltiplas (NTCPMs). O comprimento dos NTCs pode variar de nanômetros a centímetros, entretanto, o diâmetro na ordem de nanômetros depende do tipo de nanotubo (**Figura 11**) (YANG et al., 2010; SCIDA et al., 2011).

Figura 11. Ilustração dos principais tipos de NTC: (a) NTCPS e (b) NTCPM (FONTE: HIRSCH, 2002; IIJIMA, 2002).



Os NTCs apresentam excelentes propriedades mecânicas e elétricas combinadas com alta estabilidade química e térmica. Dependendo do diâmetro, disposição dimensional e quiralidade dos átomos de carbono, os NTCs podem exibir características de materiais condutores e semicondutores, podendo ser empregados como materiais em diferentes áreas tecnológicas (QURESHI et al., 2009).

Quando usados em biossensores eletroquímicos, os NTCs têm fundamental importância devido a aumentar a área de superfície sensora. Superfícies nanoestruturadas apresentam excelente condutividade elétrica e acentuada propriedade eletrocatalítica. Tais características podem aumentar a cinética de transferência de elétrons ao eletrodo, bem como melhorar a reprodutibilidade e a sensibilidade do imunossensor (YÁÑEZ-SEDEÑO & PINGARRÓN, 2010).

A funcionalização de NTCs surge como motivação de extremo interesse em imunossensores, abrindo uma gama de possibilidades para o desenvolvimento de dispositivos que reúnam as propriedades dos NTCs e permitindo a imobilização de biomoléculas de modo mais estável (LYNAM et al., 2009).

NTCs podem ser funcionalizados com diferentes grupos químicos, tais como carboxila (-COOH), amino (-NH₂), hidroxila (-OH), tiol (-SH), etc, através de ligações covalentes ou não-covalentes (BALASUBRAMANIAN & BURGHARD, 2005; ZHAO & STODDART, 2009). A introdução dos grupamentos funcionais pode atenuar as propriedades elétricas destes nanomateriais através de alterações na hibridização das ligações carbono-carbono (BALASUBRAMANIAN & BURGHARD, 2005; PENG & WONG, 2009). O reconhecimento molecular direto na superfície destes nanomateriais permite o aumento de moléculas imobilizadas, que associada às propriedades dos NTCs possibilita o desenvolvimento de sensores mais seletivos e sensíveis (LYNAM et al., 2009; ROY & GAO, 2009).

3.5.2. Filmes poliméricos condutores

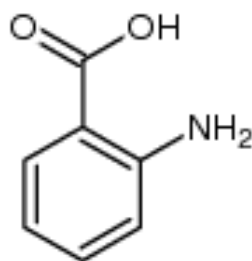
A modificação eletródica também pode ser realizada através da deposição de filmes poliméricos condutores na superfície de eletrodos. Estes filmes poliméricos podem aumentar a transdução do sinal, devido às suas características favoráveis, tais como, resistência mecânica do filme, estabilidade ao ar e em soluções aquosas, condutividade elétrica e maleabilidade para a imobilização de diversas moléculas (IONESCU et al., 2009; PINACHOA 2008).

Na fabricação de um eletrodo modificado por filme polimérico, podem-se utilizar as técnicas de dip-coating, spin-coating, eletrodeposição, electrosinning, polimerização por plasma, eletropolimerização, Langmuir-Blodgett, dentre outras (D'AMICO et al., 2000; TAO, LI & YIN, 2007). A eletropolimerização tem demonstrado ser um dos métodos mais utilizados em biossensores para deposição de polímeros sobre diversos substratos condutores devido à facilidade no controle de formação do filme (quantidade e espessura) (KUMAR & CHEN, 2008). A eletropolimerização ocorre com a primeira etapa envolvendo a eletrooxidação do monômero utilizado com a formação de um cátion-radical (INZELT et al., 2000). A dimerização é o início da segunda etapa, chamada etapa química. O crescimento da cadeia e, conseqüentemente, formação do polímero, procede via reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Por último, ocorre a eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (KUMAR & CHEN, 2008). Estes filmes eletropolimerizados geralmente contêm grupos funcionais que após ativação podem imobilizar biomoléculas via um grupo funcional específico, podendo ser hidroxilas (-OH), carbonilas (C=O), carboxilas (CO(OH)) e aminas primárias (NH₂) (TUNCAGIL et al., 2009).

Dentre os monômeros aromáticos heterocíclicos encontrados na literatura com formação de filmes poliméricos, o pirrol, tiofeno, fenileno e a polianilina têm sido os mais

estudados (TUNCAGIL et al., 2009; DU et al., 2009). O poli(ácido *o*-aminobenzóico), poli(*o*-ABA), como um derivado da polianilina, fornece diversos grupos carboxilas na superfície do polímero (**Figura 12**), podendo ligar covalentemente as biomoléculas através de seus grupamentos amina (SRIWICHAI et al., 2010).

Figura 12. Estruturas do ácido *o*-aminobenzóico (*o*-ABA). (Fonte: SRIWICHAI et al., 2010).



4. ARTIGO 01



JCR: 2.112

Elsevier Editorial System(tm) for Applied
Surface Science
Manuscript Draft

Manuscript Number: APSUSC-S-13-06359

Title: Amino-functionalization of carbon nanotubes by using a factorial design: human cardiac troponin T immunosensing application.

Article Type: Full Length Article

Keywords: carbon nanotubes; amino-functionalization; screen-printed electrode; cardiac troponin T.

Corresponding Author: Prof. Rosa Fireman Dutra, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco

First Author: Tatianny A Freitas, MSC

Order of Authors: Tatianny A Freitas, MSC; Alessandra B Mattos, PhD; Bárbara M Silva, MSC; Rosa Fireman Dutra, Ph.D.

Suggested Reviewers: Goreti F Sales PhD
Professor, Chemical, Instituto Superior de Engenharia do Porto
mgf@isep.ipp.pt
Chemical and biosensor expertise.

Maria Del Pilar T Sotomayor PhD
Professor, Chemical Department, State University of Sao Paulo
mpilarts@hotmail.com
Nanomaterials, Chemical and Biosensor expertise.

Fang Lei PhD
Researcher, Biosensor, SenDx Medical, California, USA
lfang@sendx.com
Immunosensor and enzymatic biosensor expertise.

Amino-functionalization of carbon nanotubes by using a factorial design: human cardiac troponin T immunosensing application

Tatianny A. Freitas ^a; Alessandra B. Mattos ^a; Bárbara V. M. Silva ^a and Rosa F. Dutra ^{a,*}

^a Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife - PE, Brazil.

**Corresponding Author:*

Rosa Fireman Dutra

E-mail: rosa.dutra@ufpe.br, rfiremandutra@yahoo.com.br

Phone/Fax: +55 81 2126.8200

Abstract

A simple amino-functionalization method for carbon nanotubes and its application for an electrochemical immunosensor for detection of the human cardiac troponin is described. Amino-functionalized carbon nanotubes allow an oriented antibody immobilization via their Fc regions improving the performance of immunosensors. Herein multiwalled carbon nanotubes were amino-functionalized using the ethylenediamine reagent and assays were designed by a fractional factorial study associated with Doehlert matrix. Structural modifications in the carbon nanotubes were confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy. After amino functionalization, the carbon nanotubes were attached to the screen-printed carbon electrode and a sandwich-type immunoassay was then performed for measuring the cardiac troponin T. The electrochemical measures were obtained through hydrogen peroxide reaction with peroxidase conjugated to the secondary antibody. Under optimal conditions, the developed cTnT immunosensor evaluated in serum samples showed a broad linear range (0.02 and 0.32 ng mL⁻¹) and a low limit of detection 0.016 ng mL⁻¹. This amino platform can be appropriately used as clinical tool for cardiac troponin T measurements in serum samples and acute myocardial infarction diagnostic.

Keywords: carbon nanotube; amino-functionalization; screen-printed electrode; cardiac troponin T.

1. Introduction

The screen-printing technology is a well-established and practical approach ideal for development of electrochemical point-of-care testing [1]. Screen printed electrode (SPE) provides advantages of easy miniaturization and portable instrumentation, making possible the on-site detection of different target analytes [2]. When are compared with conventional electrodes, SPEs are inexpensive, being used as disposable electrode with a large-scale production capability. Several methods have been devoted to increase the surface area of SPEs and enhance their sensitivity for electrochemical detection, including the application of nanomaterials [3, 4, 5]. The use of carbon nanotubes (CNTs) based SPEs have attracted the interest of researchers in the field of electrochemical immunosensors [6, 7, 8]. These nanomaterials specially combine several properties that improve the electrochemical performance, such as easy surface functionalization, increase on the amount of immobilized biomolecules and in the electron transfer charge on the electrode surface [9].

The surface functionalization of the CNTs by linking specific functional groups has been fundamental point for antibodies attaching as recognition element for immunosensing application. Carboxyl-terminated nanotubes have been also explored as essential functionalization strategy for covalent linkage of antibodies. However, this approach is limited because most antibodies contain amino groups randomly distributed, leading to multiple attachment sites. The random nature of this attachment sites can cause some lose of the antigen-binding activity due to the steric hindrance [10, 11]. The carboxylic groups present in Fc regions of the antibodies can be conveniently explored for oriented immobilization, exposing the FAb regions that exhibit a high affinity toward epitopes of the antigens. These groups can be form stable amide bonds with the amino groups of the CNTs [12]. Thus, amino-functionalized nanotubes can improve the reactivity antigen-antibody recognition and the efficiency immobilization process.

Techniques that are specifically aimed at improving functionalities of the CNT surfaces with amino groups include chemical treatments using acids, sheathing or wrapping the CNTs with polymer chains [13, 14], grafting of CNTs with a thin layer of polymer chains based on plasma [15], and a combination of these [16]. However, these methods to functionalize CNTs with amino groups are generally a complicated process involving a long reaction time, several coupling reagents and strictly controlled reaction conditions [17, 18]. In this work, a simple method based on fractional factorial design has been proposed for amino functionalization of the CNTs using the ethylenediamine (EDA) as crosslink amino reagent. After optimization of the process of functionalization, amino-CNTs were employed to develop an immunosensor for cardiac troponin T, important for acute myocardial infarction.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death globally according to the World Health Organization statistics. Among the cardiovascular diseases, acute myocardial infarction (AMI) is one of the most serious diseases that extremely affect people's health [19]. In the past decades, cardiac troponins (cTnT and cTnI) have been recommended as the biomarkers of choice for the serological diagnosis and prognosis of AMI because of their high sensitivity and specificity [20, 21]. In particular, the cTnT levels increase 2–4 h after the AMI symptoms and could be elevated up to 14 days after the acute episode of myocardial damage [22, 23]. Thus, the development of a rapid and practical immunosensor for detecting the cTnT in serum samples from patients with myocardial infarction is desirable due to its roles in cardiospecific diagnosis, risk stratification, prognostic risk assessment and therapeutic choices.

2. Material and methods

2.1. Reagents and materials

Mouse monoclonal antibody against cTnT (mAb-cTnT), cTnT and peroxidase conjugated mouse monoclonal antibody against cTnT (mAb-cTnT-HRP) were purchased from Calbiochem (Darmstadt, DEU). COOH-functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), were obtained from Dropsens (Oviedo, ESP). Ethylenediamine (EDA), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), dimethylformamide (DMF), glycine were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ethanol, sulfuric acid (H₂SO₄) (98% w/v) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (30% w/v) were obtained from F. Maia (Cotia, BRA). All reagents were of analytical grade. The water used to prepare all solutions was obtained from a *Milli-Q* water purification system (Billerica, USA). All the solutions were freshly prepared prior to each experiment.

2.2. Serum samples

The serum samples of cTnT were obtained from venous blood and immediately centrifuged for 120 s at 1150 rad/s. Aliquots of serum were quantified in an automatic system Roche Elecsys[®] 2010 immunoassay analyzer based on electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and the remaining serum, stored at – 20°C, was used for the electrochemical measurements. The venous blood samples were collected from donor's patient from the Cardiac Emergency of Pernambuco (PROCAPE), the Hospital of Pernambuco State University according to ethics committee's recommendations.

2.3. Apparatus and measurements

Electrochemical studies were performed using a μ Autolab III analysis system with GPES 4.9 software, Eco Chemie (Utrecht, NLD). Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) were purchased from DropSens (Oviedo, ESP). These electrodes (ref. 110) incorporate a

conventional three-electrode configuration, printed on ceramic substrates (3.4 cm × 1.0 cm). Both working (disk-shaped 4.0 mm diameter) and counter electrodes were made of carbon inks, whereas the pseudoreference electrode and electric contacts were made of silver.

Cyclic voltammetries (CV) were performed at 100 mV s⁻¹ scan rate in presence of PBS (0.01 mol L⁻¹, pH 7.0) used in all experiments as electrolyte support. The chronoamperometry was carried out in the same electrolyte at the potential of +1.4 V. All experiments were carried out at room temperature (24 °C).

2.4. Characterization of the MWCNTs

The structural characterization of the MWCNTs was evaluated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and spectra were obtained using a Bruker IFS 66 model FT-IR spectrometer in the region 4000 to 400 cm⁻¹ by the standard KBr pellet technique. The modification of the SPE surface by deposition of the MWCNTs was characterized by scanning electron microscopy (SEM) using a Philips XL30 FEG FE-SEM at 10 kV.

2.5. Amino-functionalization of the MWCNTs

Prior to use, carboxylic groups of the MWCNTs were activated using a solution of 0.1 mol L⁻¹ acetate buffer (pH 4.8) containing 0.1 mol L⁻¹ EDC and 0.2 mol L⁻¹ NHS [1:1]. At the same time, amino groups of EDA were submitted to an acid treatment H₂SO₄ solution (0.1 mol L⁻¹) for 2 h under stirring conditions at 60°C, changing their protonation state. After that, 1.0 mg activated MWCNTs was dispersed in 1.0 µL EDA treated and stirred for 2 h at room temperature (**Figure 1a**). The sample was centrifuged at 2000 x g and washed five times with deionized water to remove acid residues. The resulting amino-MWCNTs were dried at 150°C and following dispersed in DMF under sonication during 2 h.

2.6. Electrode preparation

Prior to use, the SPCE surface (0.125 cm^2) was sonicated with ethanol and deionized water, respectively for 2 min, to remove any organic contaminant. SPCE was coated with $3.0\text{ }\mu\text{L}$ of the amino-MWCNTs on the working electrode surface and dried at 40°C for absolute evaporation.

2.7. mAb-cTnT immobilization

After coated with amino-MWCNTs, the SPCE surface was incubated with an aliquot ($3.0\text{ }\mu\text{L}$) of mAb-cTnT ($1.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h. In this concentration, the maximal current was measured as resulting of antigen–antibody equilibrium demanded [24]. Subsequently, the electrode was exhaustively rinsed with 0.01 mol L^{-1} PBS (pH 7.0) to remove unbound mAb-cTnT. To avoid non-specific binding, the modified electrode surface was blocked with an aliquot ($3.0\text{ }\mu\text{L}$) of 5.0 mmol L^{-1} glycine solution for 2 h. The scheme of the stepwise immunosensor preparation is shown in **Figure 1b**.

{Please insert **Figure 1**}

2.8. Analytical measurements

For evaluating the analytical response of the immunosensor, the modified electrodes were incubated with an aliquot ($3.0\text{ }\mu\text{L}$) of the cTnT at different concentrations for 30 min. After that, the electrode was incubated with mAb-cTnT-HRP for 1 h. In each incubation step, the electrodes were carefully washed with 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 7.0).

The amperometric detection of the cTnT was monitored through the electrocatalytic reduction reaction of the H_2O_2 by the HRP-labeled secondary mAb-cTnT. The measurements were performed in 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 7.0) containing 1.5 mmol L^{-1} H_2O_2 , at room temperature. The potential range was applied from -0.5 to $+0.5\text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) with a scan

rate of 100 mV s⁻¹. The analytical response to cTnT was obtained taking into account the difference of the cathodic current (ΔI_c) of the cyclic voltammograms subtracted of the blank (without cTnT).

2.9. Multivariate optimization

The screening of variables was accomplished using a 2⁵⁻¹ fractional factorial design. Five variables were examined in two levels, lower (–) and upper (+). The subsequent factors and their levels were as follows: EDA concentration (50 – 100%), H₂SO₄ concentration (0.1 – 1.0 mol L⁻¹), time of acid treatment of the EDA (1 – 2 h), amination time (2 – 4 h) and amino-MWCNT dispersion time (2 - 4 h) (**Table 1**). After establishing the variables, a Doehlert design was used for final optimization and then was obtained the response surface. These experiments were performed in a random order and the monitored parameter was the cathodic current established by CV. Data were processed using the STATISTICAL package program (version 6.0; Stat Soft, Inc.,Tulsa, OK, USA).

{Please insert **Table 1**}

3. Results and discussion

3.1 Multivariate optimization of the amino-MWCNTs

Methods for chemical functionalization of MWCNTs have been reported by using different reactive groups, such as –NH₂, –COOH, –OH and –SH. Among these, the use of the –NH₂ groups has been a viable alternative to attach antibodies to sensing surfaces in an oriented manner via amide bonds [25]. In this study, the amino-functionalization of the MWCNTs with EDA was investigated using a fractional factorial design, which shows the influence of various factors on the experimental results and the optimum setting for each factor.

To optimize the different variables involving the amino-functionalization process of MWCNTs, a fractional factorial design associated with Doehlert matrix was used: EDA concentration (50% – 100%), H_2SO_4 concentration ($0.1 - 1.0 \text{ mol L}^{-1}$), time of acid treatment of the EDA (1 – 2 h), amination time (2 – 4 h) and amino-MWCNT dispersion time (2 – 4 h) were established according to the results attained from the 2^{5-1} fractional factorial design, and carried out in duplicate.

The Pareto diagram demonstrated that the more significant effects in the reduction current were EDA concentration and time of acid treatment of the EDA. The positive values obtained in this study indicate that by increasing these factors, the analytical signal will increase too. The factors were selected and simultaneously optimized by Doehlert design.

The EDA concentration was evaluated at five levels (10, 25, 50, 75 and 100%) and time of acid treatment of the EDA at three levels (1, 2 and 4 h). **Figure 2** shows the response surfaces obtained for the experiments considering the previously obtained effects. By analyzing the response surfaces, the optimum conditions of the experimental design generated the highest current peak. These conditions correspond to 70% and 2.5 h of the EDA concentration and time of acid treatment of the EDA, respectively.

{Please insert **Figure 2**}

3.2 Characterization of the MWCNTs

FTIR spectroscopy has proved to be a powerful tool to comply with the purpose of comprehensive characterization. The unique characteristic of the material presented by the spectrum sheds light on material properties, its behavior as well as on specific components represented by their functional groups [26].

The spectrum of the COOH-MWCNT in the **Figure 3(a)** shows typical bands of the carboxylic groups at 3445 cm^{-1} corresponding to molecular stretching of OH- groups. The

presence of the small peak at 1710 cm^{-1} is associated with the C=O stretching. These results were used as control of the amino-functionalization procedure. The **Figure 3(b)** shows the spectra of the MWCNTs before of EDA treatment. The peaks in the regions 3420 and 3170 cm^{-1} can be attributed to N–H stretch of the amino group. In addition, two peaks around 2995 cm^{-1} and 2989 cm^{-1} show the C–H stretching mode of in EDA molecule [27]. The appearance of new absorption bands at 1520 and 1340 cm^{-1} corresponding to N–H stretch of the amino group. The peak at 1120 cm^{-1} is ascribed to C–N stretching of amide groups [28]. The presence and location of the –NH_2 and C–N bands in this spectrum provides strong evidence of the introduction of EDA moieties onto the MWCNT walls. Then, the obtained results showed a successful method for amino-functionalization of the MWCNTs.

{Please insert **Figure 3**}

The SEM images were employed to morphologically characterize of the modification of the electrode surface. The surface of bare SPCE is shown in **Figure 4(a)** typically characterized by a great content of graphite particles covered with polymeric binder from the carbon ink [29]. The distribution of the graphite particles in the bare SPCE surface showed a porous structure. The morphological changes in the sensing interface after treated amino MWCNTs modification can be seen in **Figure 4(b)**. This image reveals a mesh homogeneous of the MWCNTs in the form of small bundles of tubes. The adsorbed MWCNTs have resulted in a higher roughness as compared to unmodified SPCE, by favoring an increased active surface to further antibody immobilization. SEM analysis also showed that chemical modification of the MWCNTs in the amino functionalization procedure did not affect the adsorption and formation of nanostructured film.

{Please insert **Figure 4**}

3.3 Optimization of the experimental conditions

Influence of the buffer pH is essential to analytical performance of the immunosensor, because the pH affects not only the electrochemical behavior of the sensor but also the bioactivity of the biomolecules [30]. The pH value of the 0.1 mol L⁻¹ PBS was investigated in the range 5.0 to 8.0. The measurements were obtained through cyclic voltammetric assay in presence of the 1.5 mmol L⁻¹ H₂O₂. The results showed the effect of the pH about reduction current of the SPCE (**Figure 5a**). The current reached a maximum value at pH 7.0. Thus, the optimum pH was chosen for subsequent studies.

The ionic strength studies of the PBS were investigated. These experimental parameters can be influence the charge transport rates of the electrolyte support in the electrochemical measurements of the SPCE [30]. For this assay, the SPCE was submitted to amperometric measurements in 1.5 mmol L⁻¹ H₂O₂ solution diluted in different ionic strength of PBS (0.025; 0.05; 0.10; 0.2 and 0.25 mol L⁻¹). The results obtained in the **Figure 5(b)** shows a maximum reduction current at 0.01 mol L⁻¹ of the PBS.

In order to obtain a better an optimal response with a minimum amount of HRP labeled antibody, the concentrations of the mAb-cTnT-HRP were optimized. The SPCE with immobilized mAb-cTnT was coated with cTnT (2.5 ng mL⁻¹) for 1 h and in following incubated with different concentrations of the mAb-cTnT-HRP (0.01 to 5.0 µg mL⁻¹). As can be seen in the **Figure 5(c)**, the reduction current increased with the increasing concentration of the anti-cTnT-HRP until the concentration reached 1.0 µg mL⁻¹.

{Please insert **Figure 5**}

3.4. Reproducibility and stability

A key problem in the use of immunosensors is the reproducibility of certain results and to know how long these devices can operate with a reproducible response [31]. In the

reproducibility study, 10 different electrodes were prepared under same conditions and evaluated with cTnT samples (2.5 ng mL⁻¹). The immunosensor reached an acceptable reproducibility with a relative standard deviation (RSD) of 2.5% (**Figure 6a**). Regarding the repeatability, immunosensor showed significantly stable for 20 measurements in the same electrode registered in each 1 min interval. This statement was confirmed by low RSD (1.34%) (**Figure 6b**). These results can be attributed to strong interaction between the amino-MWCNT film and mAb-cTnT immobilized.

{Please insert **Figure 6**}

3.5. Determination of cTnT in human serum

Human serum samples spiked with different cTnT concentrations were analyzed by chronoamperometry fixing the working potential at – 0.3 V at 120 s (**Figure 7**). The amount of cTnT of serum samples was previously measured by Roche Elecsys® 2010 immunoassay analyzer based on ECLIA. The immunosensor measurements showed a good agreement with the ECLIA method at 95% confident level when paired *t*-test was applied. As shown in **Figure 7**, the calibration plot exhibited a good linear correlation between 0.02 and 0.32 ng mL⁻¹ cTnT (*r*=0.985, *n*=5, *p*<0.001). The limit of detection (LOD) of the SPCE was calculated according to the following equation:

$$\text{LOD} = 3SD/m \quad (\text{Eq. 1})$$

where **SD** is standard deviation of the blank measurement and ***m*** is the slope of the linear part of the calibration curve [32]. The LOD was estimated in 0.016 ng mL⁻¹ showing a high sensitivity, thereby this immunosensor can be useful for cTnT determination in clinical routine, since the cutoff is found at approximately 0.02 ng mL⁻¹ in the AMI diagnosis.

{Please insert **Figure 7**}

Conclusions

Herein, it was proposed a simpler method for amino functionalization of the MWCNTs than previously described. It does not require time-consuming and costly multistep reactions, several coupling reagents or strictly controlled processes. The experimental conditions were optimized using a fractional factorial showing that the time protonation and EDA concentration as limitants for successful in functionalization of the MWCNTs. It was possible an oriented immobilization of anti-cTnT and development of an immunosensor for cTnT with high sensitivity and reproducibility for AMI diagnostic.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Brazilian agency. T. A. Freitas, PhD student, is grateful to FACEPE (Brazil) by scholarship during this work. The assistance of the PROCAPE (Cardiac Emergency of Pernambuco, Recife - PE, Brazil) is also acknowledged.

References

- [1] J. P. Metters, C. E. Banks, Screen-printed electrodes open new vistas in sensing: application to medical diagnosis, in: M. Schlesinger (Ed.), Applications of electrochemistry in medicine, Springer, New York, 2013, pp. 83-120.
- [2] N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Ex situ deposited bismuth bilm on screen-printed carbon electrode: a disposable device for stripping voltammetry of heavy metal ions, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1460–1467.
- [3] M. Díaz-González, D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García, Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta*, 65 (2005) 565–573.
- [4] P. Ekabutr, O. Chailapakul, P. Supaphol, Modification of disposable screen-printed carbon electrode surfaces with conductive electrospun nanofibers for biosensor applications, *Journal of Applied Polymer Science*, (2013) 1-9.

- [5] C.I.L. Justino, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45 (2013) 24-36.
- [6] I. Willner, B. Willner, Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures, *Nano Letters*, 10 (2010) 3805-3815.
- [7] C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton, Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Analytica Chimica Acta*, 662 (2010) 105-127.
- [8] S.K. Vashist, D. Zheng, K. Al-Rubeaan, J.H.T. Luong, F.-S. Sheu, Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications, *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 169-188.
- [9] C. Singh, S. Srivastava, M.A. Ali, T.K. Gupta, G. Sumana, A. Srivastava, R.B. Mathur, B.D. Malhotra, Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185 (2013) 258-264.
- [10] P. Peluso, D. S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L. S. Jung, P. Wagner, S. Nock, Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays, *Analytical Biochemistry* 312 (2003) 113–124.
- [11] C. Chen, A. Baeumner, R. Durst, Protein G-liposomal nanovesicles as universal reagents for immunoassays, *Talanta*, 67 (2005) 205-211.
- [12] Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C. Fan, Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics, *Biosensors and Bioelectronics*, 47 (2013) 1-11.
- [13] B. Z. Tang, H. Xu, Preparation, alignment and optical properties of soluble poly(phenylacetylene)-wrapped carbon nanotubes, *Macromolecules* 32 (1999) 2569-2576.
- [14] D. E. Hill, Y. Lin, A. M. Rao, L. F. Allard, Y-P. Sun, Functionalization of carbon nanotubes with polystyrene, *Macromolecules*, 35 (2002) 9466-9471.
- [15] D. Shi, J. Lian, P. He, L.M. Wang, F. Xiao, L. Yang, M.J. Schulz, D.B. Mast, Plasma coating of carbon nanofibers for enhanced dispersion and interfacial bonding in polymer composites, *Applied Physics Letters*, 83 (2003) 5301.
- [16] S.W. Kim, T. Kim, Y.S. Kim, H.S. Choi, H.J. Lim, S.J. Yang, C.R. Park, Surface modifications for the effective dispersion of carbon nanotubes in solvents and polymers, *Carbon*, 50 (2012) 3-33.
- [17] M.R.S. Castro, H.K. Schmidt, Preparation and characterization of low- and high-adherent transparent multi-walled carbon nanotube thin films, *Materials Chemistry and Physics*, 111 (2008) 317-321.
- [18] W.-M. Chiu, Y.-A. Chang, Chemical modification of multiwalled carbon nanotube with the liquid phase method, *Journal of Applied Polymer Science*, 107 (2008) 1655-1660.

- [19] H. D. White, D. P. Chew, Acute myocardial infarction, *The Lancet*, 372 (2008) 570-58.
- [20] A.A. Mohammed, J.L. Januzzi, Clinical Applications of Highly Sensitive Troponin Assays, *Cardiology in Review*, 18 (2010) 12-19.
- [21] F.S. Apple, A.H.B. Wu, A.S. Jaffe, European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: How to use existing assays clinically and for clinical trials, *American Heart Journal*, 144 (2002) 981-986.
- [22] J. Shen, W. Huang, L. Wu, Y. Hu, M. Ye, Thermo-physical properties of epoxy nanocomposites reinforced with amino-functionalized multi-walled carbon nanotubes, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 38 (2007) 1331-1336.
- [23] Z. Yang, D. Min Zhou, Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction, *Clinical Biochemistry*, 39 (2006) 771-780.
- [24] A.B. Mattos, T.A. Freitas, L.T. Kubota, R.F. Dutra, An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum, *Biochemical Engineering Journal*, 71 (2013) 97-104.
- [25] M.-L. Sham, J.-K. Kim, Surface functionalities of multi-wall carbon nanotubes after UV/Ozone and TETA treatments, *Carbon*, 44 (2006) 768-777.
- [26] E. Smidt, K. Bohm, M. Schwanninger, The application of FT-IR spectroscopy in waste management, in: G. Nikolic (Ed.), *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR Strategies*, InTech, Rijeka, 2011, pp. 405-430.
- [27] J. Xiong, Z. Zheng, X. Qin, M. Li, H. Li, X. Wang, The thermal and mechanical properties of a polyurethane/multi-walled carbon nanotube composite, *Carbon*, 44 (2006) 2701-2707.
- [28] J. Shen, W. Huang, L. Wu, Y. Hu, M. Ye, Thermo-physical properties of epoxy nanocomposites reinforced with amino-functionalized multi-walled carbon nanotubes, *Composites part A: Applied Science and Manufacturing*, 38 (2007) 1331-1336.
- [29] R.O. Kadara, N. Jenkinson, C.E. Banks, Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138 (2009) 556-562.
- [30] L. Ruiyi, X. Qianfang, L. Zaijun, S. Xiulan, L. Junkang, Electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of microcystin-LR based on graphene-gold nanocomposite/functional conducting polymer/gold nanoparticle/ionic liquid composite film with electrodeposition, *Biosensors and Bioelectronics*, 44 (2013) 235-240.
- [31] N. B. Ramírez, A. M. Salgado, B. Valdman, The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26 (2009) 227-249.
- [32] G. L. Long, J. D. Winefordner, Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry*, 55 (1983) 713A-724A.

FIGURES

Figure 1

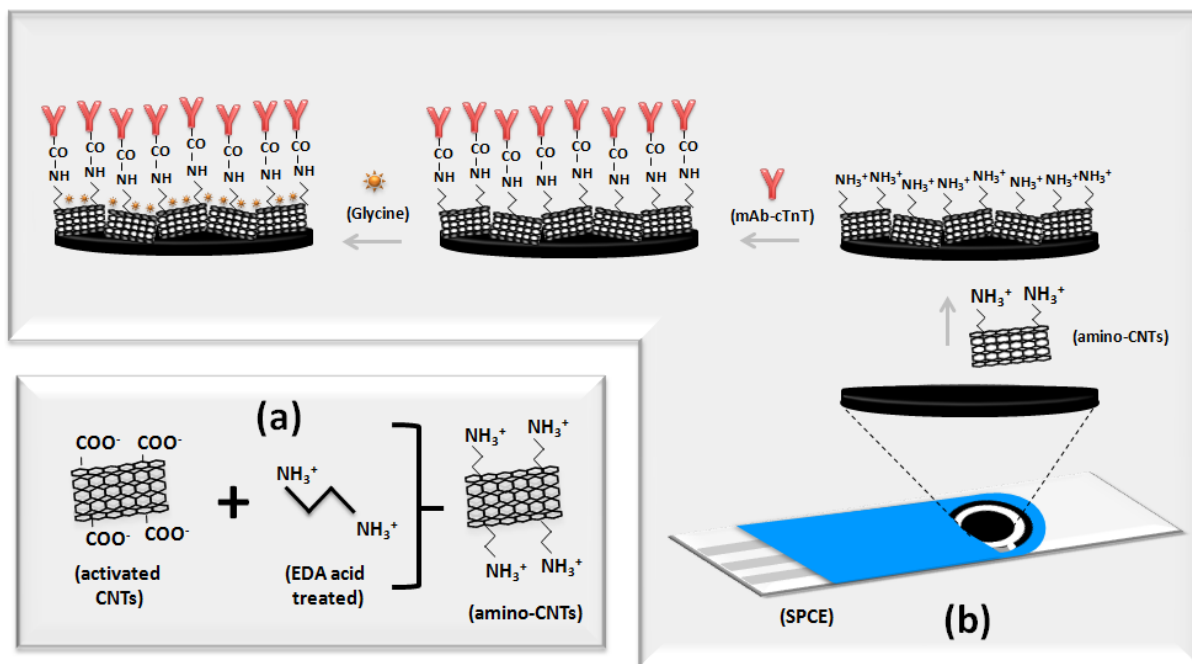


Figure 2

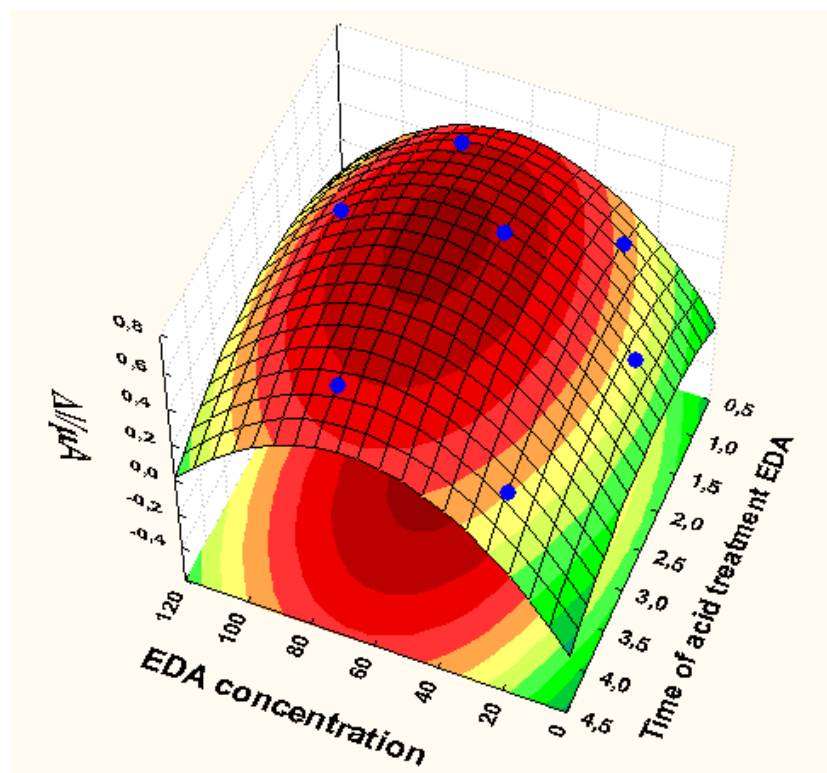


Figure 3

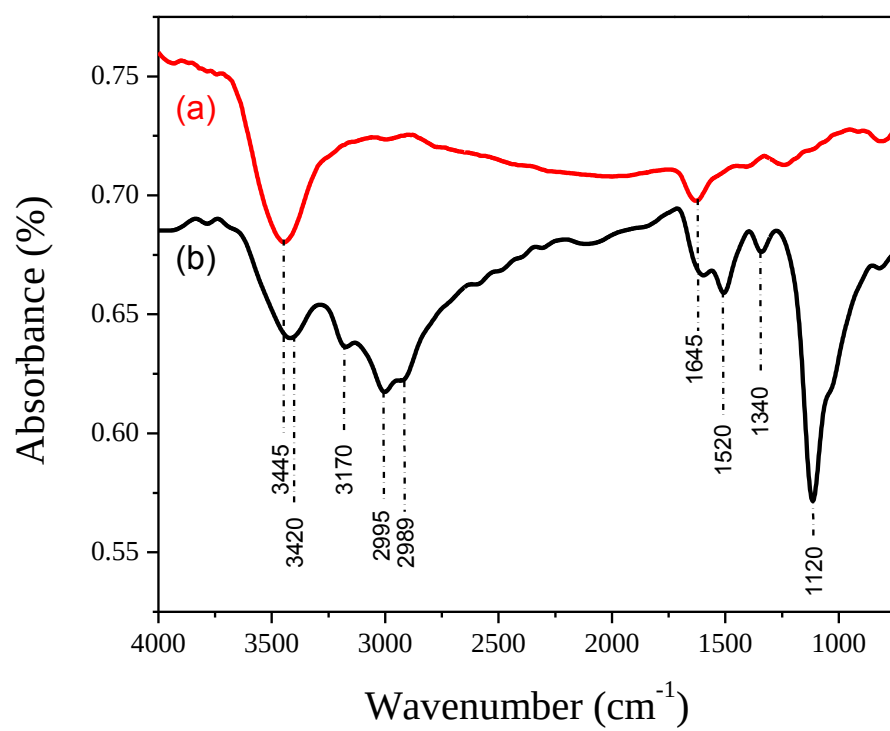


Figure 4

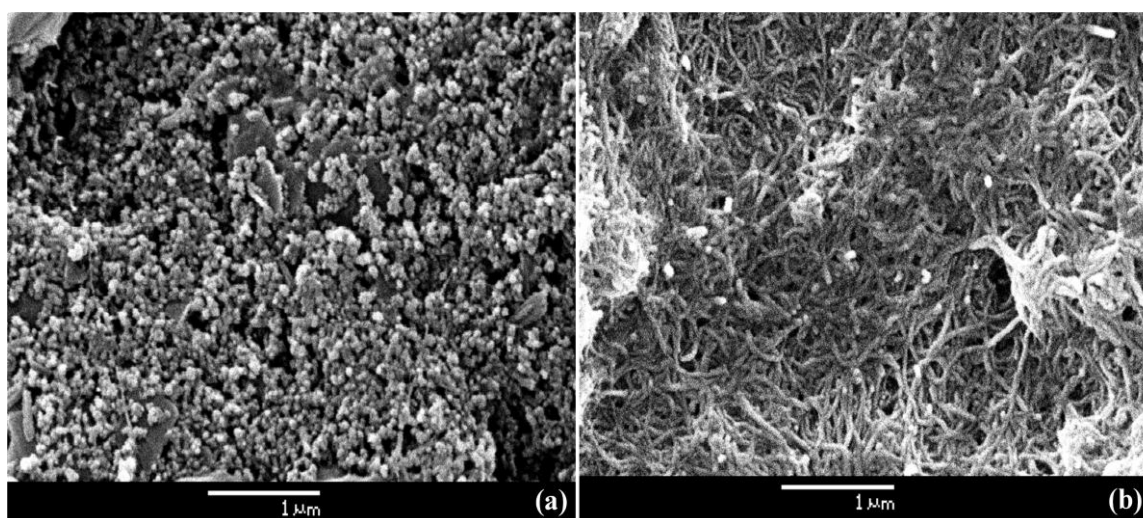
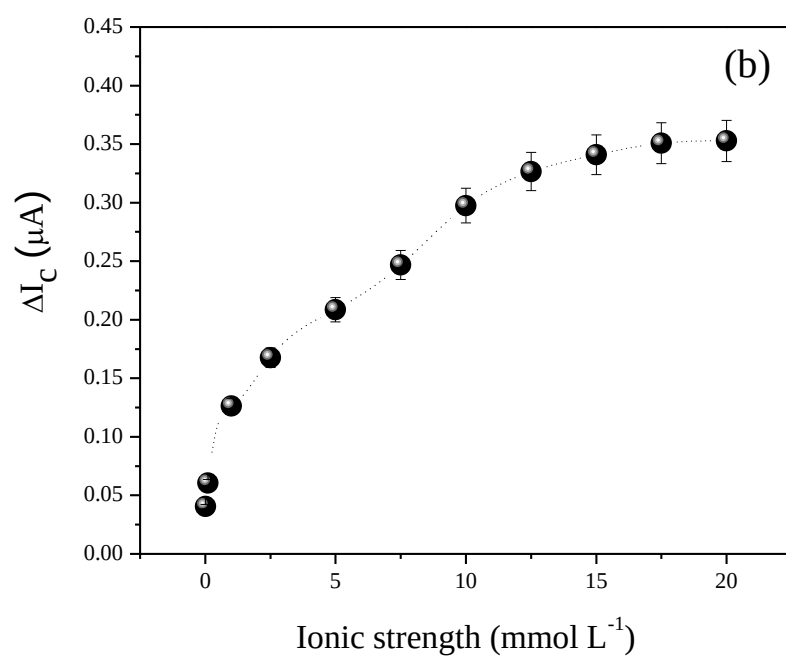
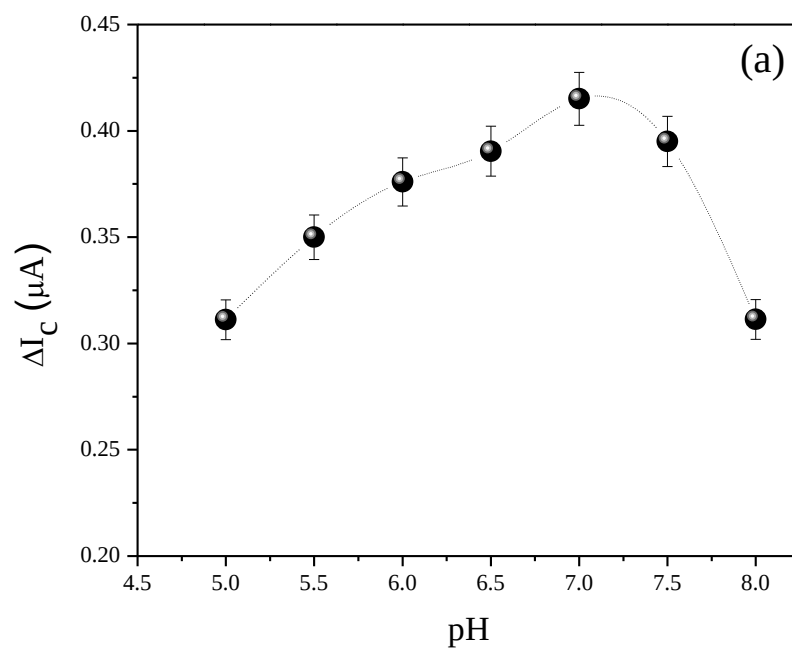


Figure 5



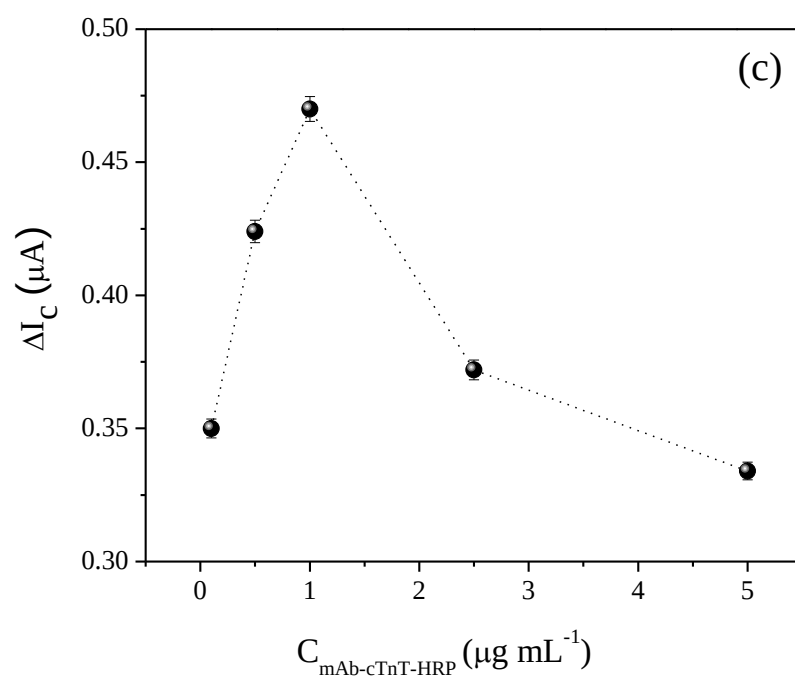


Figure 6

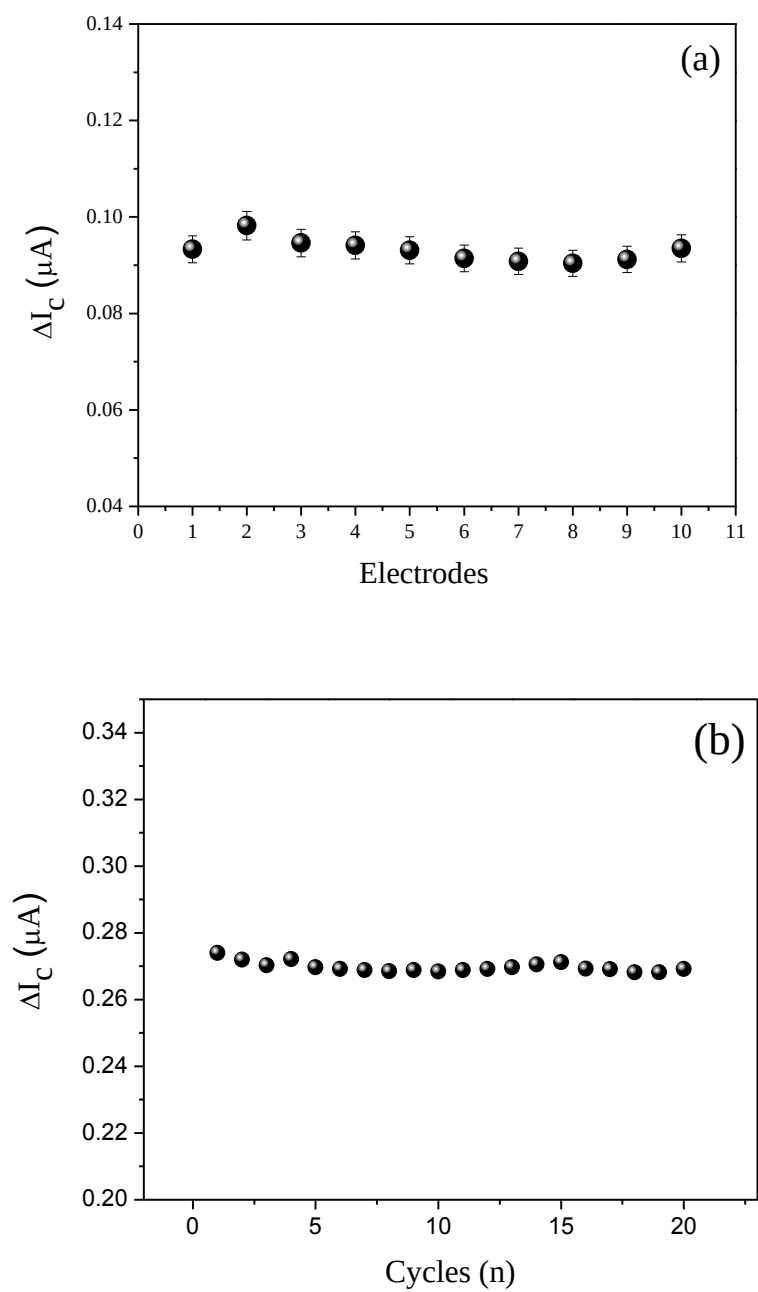


Figure 7

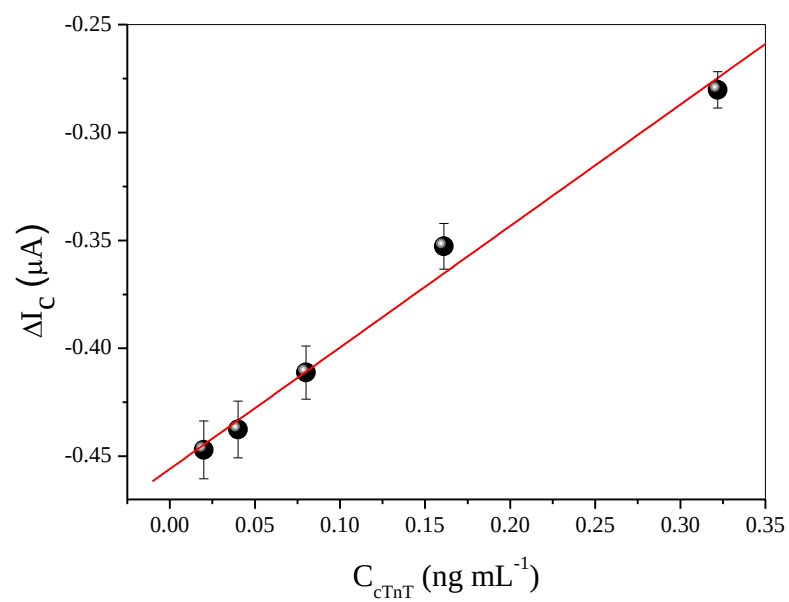


FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Schematic illustration of stepwise assembling of the immunosensor.

Figure 2. Surface response obtained from the Doehlert design employed for the optimization of the EDA concentration and time of acid treatment of the EDA in the amino functionalization MWCNT procedure. The optimum conditions correspond to 70% and 2.5 h, respectively.

Figure 3. FTIR spectra of the MWCNTs **(a)** before and **(b)** after EDA treatment.

Figure 4. SEM image of working area of the SPCE **(a)** bare and **(b)** amino treated MWCNT modified.

Figure 5. Influence of **(a)** pH values, **(b)** ionic strength of the PBS and **(c)** the amount of the mAb-cTnT-HRP on the cathodic peak current of the SPCE. Measurements obtained by cyclic voltammetry experiments in presence of the $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$.

Figure 6. **(a)** Reproducibility and **(b)** repeatability of the SPCE to $2.5 \text{ ng mL}^{-1} \text{ cTnT}$.

Figure 7. Calibration curve of the resulting immunosensor for the detection of cTnT.

TABLE

Table 1. Experimental factors and their levels employed in 2^{5-1} fractional factorial design for amino functionalization of the MWCNT procedure.

Experiment	EDA concentration	H ₂ SO ₄ concentration	Time of acid treatment of the EDA	Amination Time	amino- MWCNT dispersion time	ΔI (μA) mean values
	– (50%) + (100%)	– (0.1 mol L ⁻¹) + (1.0 mol L ⁻¹)	– (1 h) + (2 h)	– (2 h) + (4 h)	– (2 h) + (4 h)	
1	-	-	-	-	+	0.5757
2	+	-	-	-	-	0.4328
3	-	+	-	-	-	0.2803
4	+	+	-	-	+	0.2803
5	-	-	+	-	-	0.4131
6	+	-	+	-	+	0.4278
7	-	+	+	-	+	0.6383
8	+	+	+	-	-	0.3049
9	-	-	-	+	-	0.4065
10	+	-	-	+	+	0.3443
11	-	+	-	+	+	0.4319
12	+	+	-	+	-	0.2983
13	-	-	+	+	+	0.2492
14	+	-	+	+	-	0.2131
15	-	+	+	+	-	0.4820
16	+	+	+	+	+	0.4475

5. ARTIGO 02



JCR: 2.579

Elsevier Editorial System(tm) for Biochemical Engineering Journal

Manuscript Draft

Manuscript Number: BEJ-D-12-00286

Title: An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum

Article Type: Full Length Article

Keywords: immunosensor; poly(o-aminobenzoic acid); acute myocardial infarction; cardiac troponin T

Corresponding Author: Professor Rosa Fireman Dutra, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco

First Author: Alessandra B Mattos, PhD

Order of Authors: Alessandra B Mattos, PhD; Tatianny A Freitas, PhD student; Lauro T Kubota, PhD; Rosa Fireman Dutra, Ph.D.



Regular article

An *o*-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serumAlessandra B. Mattos^a, Tatianny A. Freitas^a, Lauro T. Kubota^b, Rosa F. Dutra^{a,c,*}^a Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil^b Department of Analytical Chemistry, Chemical Institute, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil^c Cardiac Emergency of Pernambuco, PROCAPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2012

Received in revised form 4 December 2012

Accepted 5 December 2012

Available online 12 December 2012

Keywords:

Immunosensor

Poly(*o*-aminobenzoic acid)

Acute myocardial infarction

Cardiac troponin T

ABSTRACT

An amperometric immunosensor for cardiac troponin T detection in human serum troponin T, a marker considered as “gold standard” for acute myocardial infarction diagnosis, is described. A stable carboxylic film to covalently bind antibodies against cTnT onto electrode surface was achieved with electropolymerization of the *o*-aminobenzoic acid. A fractional factorial study was performed to optimize the electropolymerization parameters. Cyclic voltammetry assays were carried out for characterize steps of the modified electrode surface. The obtained calibration curve at -0.05 V by amperometry presented a good linear response range from 0.05 to 5.0 ng mL⁻¹ cTnT with a correlation coefficient of 0.992 ($n=6$) and 0.016 ng mL⁻¹ detection limit. The electrodes showed a good stability upon the analytical responses retaining 91.6% of its initial response after 18 days. This sensor showed outgoing results regarding sensitivity allowing reliable measurements of the cTnT at levels of clinical significance for acute myocardial infarctions diagnosis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is the rapid development of myocardial necrosis caused by a critical imbalance between oxygen supply and demand of the myocardium [1]. This usually results from plaque rupture with thrombus formation in a coronary vessel, resulting in an acute reduction of blood supply to a portion of the myocardium [2]. Troponins are the most specific and sensitive biochemical markers of myocardial cell injury and therefore have been highlighted as the “gold standard” testing for the AMI [3,4]. The troponins remain abnormal for 4–10 days after the onset of AMI [5], with the concentration peak closely correlated with the infarct size [6,7].

Analytical methods to improve the timely diagnosis of this disease have been important to appropriate disposition and treatment of AMI patients [8]. Rapid and safe tests implies on a significant reduction in mortality and also in the hospital stay. Immunoassays have become the better technique in clinical diagnostics for determining cardiac and other clinically relevant biomarkers. Currently, the conventional methods for detection of troponin T (cTnT) include enzyme immunoassay [9], fluoroimmunoassay [10] and electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) [11].

However, these methods require laboratory equipments with proper instrument, multi-step processings of samples and well-trained personnel, leading to considerable time consuming and expense to the overall detection. Immunosensors consisting of an antigen or antibody coupled to transducer to generate a quantitative response by immunocomplexing have been pointed as attractive alternatives. They can provide faster and more practical diagnosis due to their portability possible being indicated when a quick therapeutic procedure is required.

Recently, several attempts for determination of cTnT by immunosensors have been performed by different transducers [12–14] based on surface plasmon resonance and piezoelectric techniques. Although these sensing instruments show in particular some features as fast response and the non-labeling, they are difficult to miniaturize and to operate in the field as point-of-care device [15–17]. Electrochemical transducers based on amperometric responses generated by enzymes conjugated to the antibodies spend more time to analyze, they has been pointed out as more attractive due to easier compatibility and lower cost [12].

In an attempt to overcome difficulties regarding antibodies immobilization using a simple technique without compromising the high sensitivity required, given the fact that detection levels for the clinical diagnosis of AMI are in level of few nanograms per mL of cTnT, herein a conductive polymer was employed to anchor antibodies against cTnT [18,19]. The use of polymer films deposited on the electrode surface has been showed as alternative to a stable and irreversible immobilization of the biomolecules,

* Corresponding author at: Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21268200; fax: +55 81 21268000.

E-mail addresses: rosa.dutra@ufpe.br, rfiremandutra@yahoo.com.br (R.F. Dutra).

because they can provide reactive groups such as $-\text{COOH}$ or $-\text{NH}_2$ [20–22] to link these biomolecules. Polymeric films can be obtained by dip- or spin-coating, electrodeposition, plasma polymerization and electropolymerization [23,24]. Among these methods, the electropolymerization has been the most used [25]. It consists of non-manual electrochemical addressing of polymer deposition in which the main advantage hence is a higher reproducibility of the obtained film. This technique results in more stable and homogeneous electroactive areas that implies on more reliability in the developed sensors. Since the active functional groups are provided by these polymers, it is possible to generate strong linkages of between biomolecules and the coated electrode surface without lost of the film conductivity [26,27]. Other interesting propriety of polymers to biosensor is about the possibility to enhance the electron transfer between the electroactive species and to the electrode surface [28,29].

In this work, the poly-*o*-aminobenzoic acid, (poly-*o*-ABA), that is polyaniline derivative with carboxyl groups was used to covalent bind antibodies by their amino reactive groups of the side chains. The poly-*o*-ABA, a conductor polymer was electropolymerized on a glassy carbon electrode using the sweep linear voltammetry technique. The modified electrode provides abundantly carboxyl groups, acting as functional group to covalently immobilize the monoclonal antibodies against cTnT through an amide bond.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

The cTnT, mouse monoclonal antibody against cTnT (mAb-cTnT) and peroxidase conjugated mouse monoclonal antibody against cTnT (mAb-cTnT-HRP) were purchased from Calbiochem (USA). The *o*-ABA, ethanolamine, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), hydroquinone, sulfuric acid (H_2SO_4) and potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) were acquired from Sigma–Aldrich (USA). Hydrogen peroxide (H_2O_2) (30%, v/v) and ethanol were acquired from Synth (São Paulo, Brazil). All reagents were of analytical grade. The water used to prepare all solutions was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, USA). All the solutions were freshly prepared prior to each experiment.

2.2. Serum samples

The serum samples were obtained from venous blood and immediately centrifuged for 120 s at 1150 rad/s. The venous blood samples were collected from donor's patient from the Cardiac Emergency of Pernambuco (PROCAPE), Hospital of Pernambuco State University according to ethics committee's recommendations. The samples (200 μL) were spiked with an aliquot (20 μL) of the cTnT prepared in PBS at different concentrations. Afterwards, the spiked serum samples were analyzed by a Roche Elecsys® 2010 immunoassay analyzer based on electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA).

2.3. Apparatus

Electrochemical measurements were conducted using the $\mu\text{Autolab III}$ analysis system with GPES 4.9 software (Eco Chimie BV, Netherlands). An electrochemical cell consisting of three electrodes was used, being formed by an Ag/AgCl electrode as reference, a platinum wire electrode as auxiliary and a glassy carbon electrode as working. The measurements were carried out using 10.0 mL of 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.0. In order to compensate the fluctuation of background current and variations

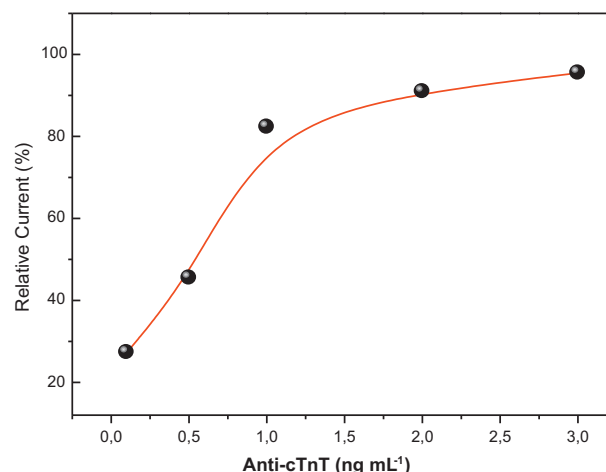


Fig. 1. Effect of the amount mAb-cTnT immobilized on the electrode surface.

of manufacturing between electrodes, the current responses presumed was calculated subtracting from blank, i.e. after anti-cTnT incubation. It was defined the relative current change as following expression $I(\%) = (I - I_0) \times 100\% / I_0$ where I_0 is the current after anti-cTnT immobilization and I is the current after exposure to cTnT at a particular concentration.

Cyclic voltammeteries (CV) were performed in a potential between -0.2 and $+0.4$ V versus Ag/AgCl electrode at 100 mV s^{-1} scan rate. The chronoamperometry was carried out in the same electrolyte at the potential of -0.05 V. All experiments were carried out at approximately 24°C (room temperature), under stirring conditions.

The topography of the polymer film on the electrode surface was verified using atomic force microscopy. The images were carried out in an Accurex II system with tripod scanner (TopoMetrix 1660, USA).

2.4. Preparation of poly(*o*-ABA) modified electrode

Prior to use, the electrode surface (0.02 cm^2) was manually polished with alumina slurries ($0.3 \mu\text{m}$) and rinsed with double distilled water. Then, it was sonicated with ethanol and deionized water, respectively for 5 min, to remove any organic contaminant. The electropolymerization was performed in 10.0 mmol L^{-1} *o*-ABA solution in 0.5 mol L^{-1} H_2SO_4 by sweep linear voltammetry. The voltammograms were carried out in a potential range between -0.8 and $+1.6$ V for 20 scans at 70 mV s^{-1} . The poly(*o*-ABA) modified electrode, was subsequently coated with freshly mixed of EDC (0.1 mol L^{-1})/NHS (0.2 mol L^{-1}) solution (1:1, v/v) in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer at pH 4.8 for 1 h to activate the carboxylic acid group of poly(*o*-ABA) to *N*-hydroxysuccinimide ester.

2.5. mAb-cTnT immobilization and surface blocking

After the electropolymerization, the electrode surface was incubated with an aliquot (10.0 μL) of mAb-cTnT ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h. In this concentration, the maximal current was measured as resulting of the antigen–antibody equilibrium demanded (Fig. 1). After the mAb-cTnT incubation, the electrode was exhaustively rinsed with 0.1 mol L^{-1} PBS at pH 7.0 to remove unbound the mAb-cTnT. In order to avoid non-specific binding, the modified electrode surface was blocked with an aliquot (30.0 μL) of 5.0 mmol L^{-1} ethanolamine solution by incubation for 2 h.

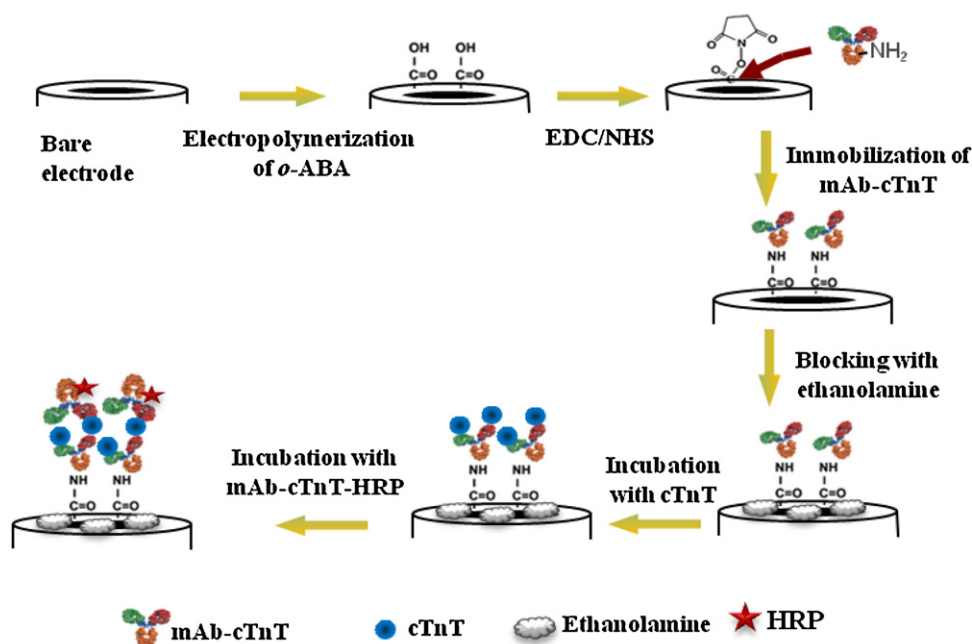


Fig. 2. Schematic diagram of the assembly of the poly(*o*-ABA) modified electrode.

2.6. Analytical measurements

For evaluating the analytical response of the immunosensor, the modified electrodes were incubated with an aliquot (10.0 μL) of the cTnT at different concentrations for 1 h. After that, they were incubated with an aliquot (10.0 μL) of the mAb-cTnT-HRP (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h. Then, the analytical signals were monitored through the HRP catalyzed reaction, using 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 . Between each incubation steps, the electrodes were washed with PBS (0.1 mol L^{-1} , pH 7.0). The scheme of poly(*o*-ABA) modified immunosensor is shown in Fig. 2.

2.7. Multivariate optimization

The screening of variables associated to electropolymerization procedure was accomplished using a 2^{4-1} fractional factorial design. Four variables were examined in two levels, lower (–) and upper (+). The subsequent factors and their levels were as follows: *o*-ABA concentration (10.0–40.0 mmol L^{-1}), scans number of the electropolymerization (20–40), scan rate (10–40 mV s^{-1}) and H_2SO_4 concentration (0.1–1.0 mol L^{-1}) (Table 1). After establishing the variables, which exert significant influence on the analytical response, a Doehlert design was used for final optimization and then the response surface was obtained. These experiments were performed in a random order and the monitored parameter was the cathodic current peak obtained by CV. Data were processed using the STATISTICAL package program (version 6.0; Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Multivariate optimization of the electropolymerization procedure

In order to optimize the analytical method to attain the best sensitivity as well as to reduce the number of assays, a fractional factorial design associated with Doehlert matrix was used. The *o*-ABA concentration, scans number of the electropolymerization,

scan rate and electrolyte concentration (H_2SO_4) were established according to the results obtained from the 2^{4-1} fractional factorial design. From the Pareto chart, more significant effects of the electropolymerization were scan rate and H_2SO_4 concentration.

The results showed that by increasing these factors, since they are all positive values, it will result in an increase on the cathodic current peak response of the modified electrode. The factors were selected and simultaneously optimized by Doehlert design. The scan rate was evaluated at five levels (30, 40, 50, 80 and 100 mV s^{-1}) and H_2SO_4 concentration at three levels (0.1, 0.5 and 1.0 mol L^{-1}). Fig. 3 shows the response surfaces obtained for the experiments considering the previously obtained effects. By analyzing the response surfaces, the optimum conditions, inside the experimental design that generated the highest current peak

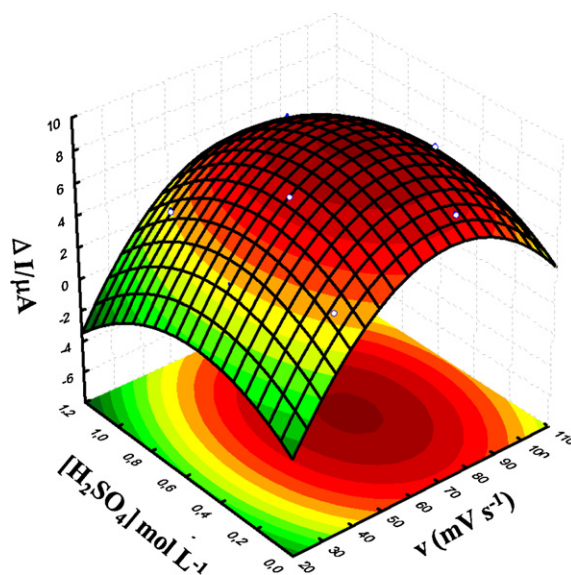


Fig. 3. Surface response obtained from the Doehlert design employed for the optimization of the *o*-ABA electropolymerization. The optimum conditions correspond to 70 mV s^{-1} and 0.5 mol L^{-1} H_2SO_4 .

Table 1Experimental factors and their levels employed in 2^{4-1} fractional factorial design for poly(*o*-ABA)-modified electrode.

Experiment	Scans –(20) +(40)	[<i>o</i> -ABA] mmol L ^{–1} –(10.0) +(40.0)	[H ₂ SO ₄] mol L ^{–1} –(0.1) +(1.0)	ν (mV s ^{–1}) –(10) +(40)	ΔI (μA) (mean values)
1	–	–	–	–	10.4008
2	+	–	–	+	10.8175
3	–	+	–	+	10.4380
4	+	+	–	–	9.19660
5	–	–	+	+	12.1606
6	+	–	+	–	11.0584
7	–	+	+	–	11.3412
8	+	+	+	+	11.8427

were determinate. These conditions correspond to 70 mV s^{–1} and 0.5 mol L^{–1} of the scan rate and H₂SO₄ concentrations, respectively.

3.2. Poly(*o*-ABA) film formation on the electrode surface

The modified electrode was fabricated in 0.5 mol L^{–1} H₂SO₄ solution containing 10.0 mmol L^{–1} of *o*-ABA. The film was grown on the electrode surface by linear sweep voltammetry between –0.8 and +1.6 V for 20 scans. Fig. 4a shows the first cycle of the electropolymerization with an expressive peak at +1.12 V that is attributed to the *o*-ABA monomer oxidation to free radicals. The growth of the *o*-ABA film was monitored by successive scans (inset Fig. 4a). A decrease of the oxidation peaks with the scans indicates that the *o*-ABA polymer is being formed on the electrode surface. From the twentieth scan, the polymerization reached the saturation and the film was then deposited on the electrode surface.

3.3. Characterization of the poly(*o*-ABA) modified electrode

The electropolymerization enhances homogeneous film formation on the electrode surface, regardless of its shape or size, with a control of thickness and roughness [28]. Herein, the atomic force microscopy technique was employed to characterize the poly(*o*-ABA) modified electrode surface, since thickness measured is directly related to the formation of polymer film. From the micrograph shown in Fig. 4b, the thickness of the electrode surface increased from 149.3 nm to 775.3 nm.

The CV is a valuable and convenient tool for providing electrochemistry information regarding the electrode modifying, as well as the activity and stability of immobilized reagents [29]. Herein, the assembly of the modified electrode was also characterized by CV using 0.1 mmol L^{–1} K₃Fe(CN)₆ solution as probe. Fig. 4c represents the CV responses on the bare electrode, poly(*o*-ABA) modified

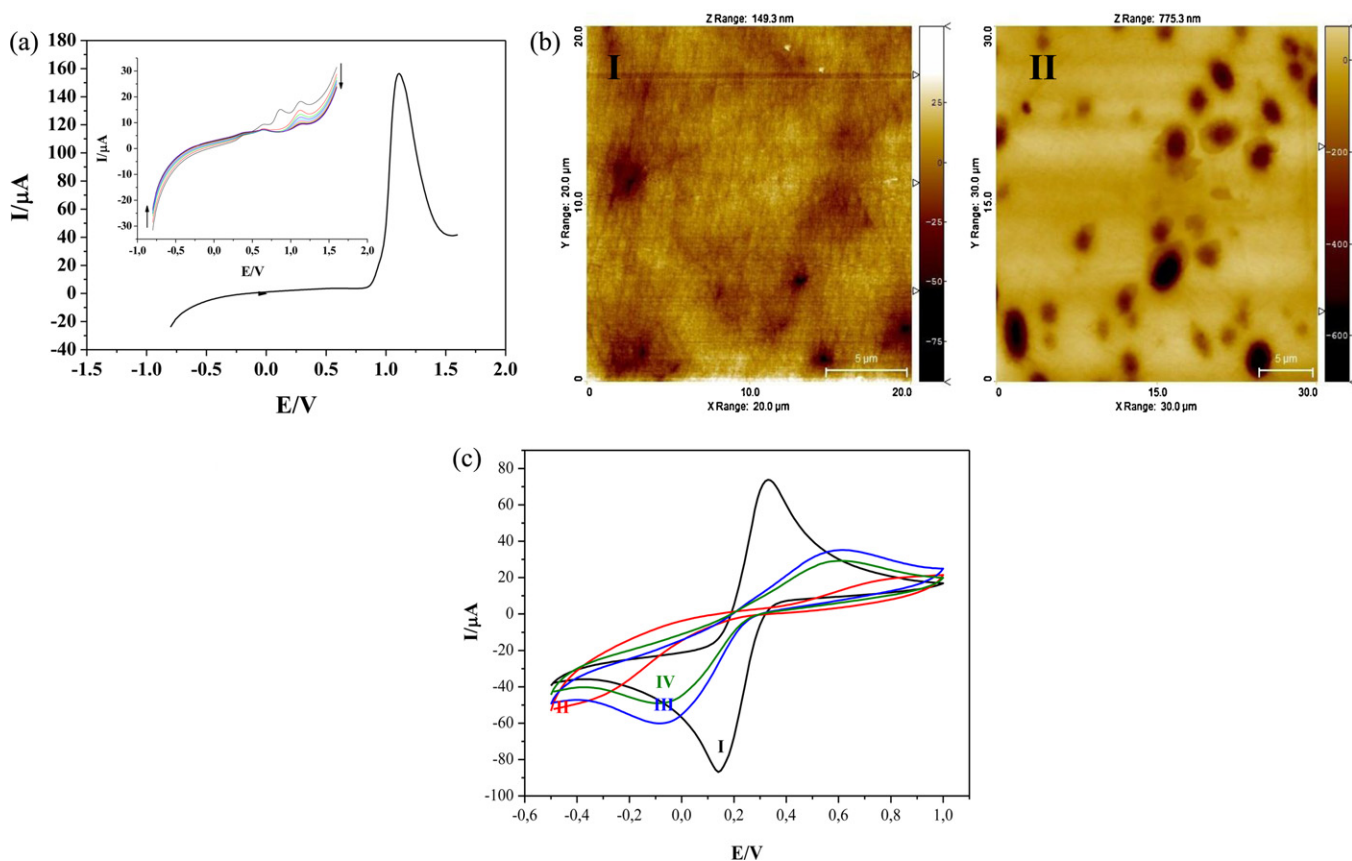


Fig. 4. (a) Voltammograms recorded for the working electrode in 0.5 mol L^{–1} H₂SO₄ during the electrochemical oxidation of 10.0 mmol L^{–1} *o*-ABA. Scan rate 70 mV s^{–1} and 20 scans. (b) Atomic force micrograph image of the bare electrode (I) and poly(*o*-ABA) modified electrode (II). (c) CVs of the poly(*o*-ABA) modified electrode in 5.0 mol L^{–1} K₃Fe(CN)₆ prepared in 0.1 mol L^{–1} KCl at different stages: bare electrode (I); poly(*o*-ABA) modified electrode (II); activation with EDC/NHS (III); mAb-cTnT immobilized on the electrode (IV).

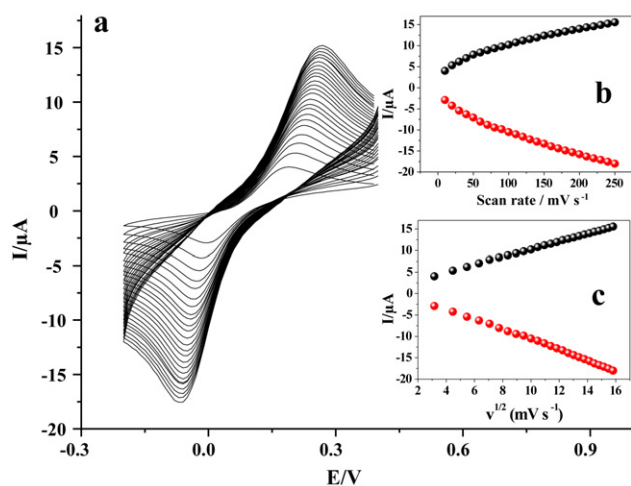


Fig. 5. CVs of the poly(*o*-ABA) modified electrode at different scan rates (10–250 mV s^{-1}) (a). The inset shows the relationship between the peak currents and scan rate (b) and relationship between the peak currents and the square root of scan rate (c). Supporting electrolyte PBS containing 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 and 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone.

electrode, activation with EDC/NHS and mAb-cTnT immobilized electrode. A pair of well defined redox peaks was observed at the bare electrode (curve I) compared to the electrode modified after electropolymerization, which showed significant decrease of the currents peaks (curve II). This behavior is attributed to film-formation, which blocks the electron transfer to the electrode surface. Prior to bind the mAb-cTnT, poly(*o*-ABA) carboxylic acid

groups were activated with EDC and NHS, which is indicated by current peak increase (curve III). It was also observed that the anodic peak was higher than the cathodic peak. Probably occurred an electrostatic repulsion between the highly negatively charged carboxyl groups of the poly(*o*-ABA) film and the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. The activation of the carboxylic acid group is important to leaves the electrode surface with a succinimide ester terminal that is susceptible to nucleophilic attack by amine groups of the antibody to form a amide peptide bond [30]. Finally, the mAb-cTnT was immobilized to the poly(*o*-ABA) coated electrode by a covalent linkage. It was confirmed by a decrease of the redox peaks that is attributed to insulating nature of the proteins (curve IV).

To investigate the electrochemical process that occur between the surface of modified electrode and the electrolyte solution, a study was conducted varying the scan rates from 10 to 250 mV s^{-1} (in 0.1 mol L^{-1} PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 (Fig. 5a)). It was observed the dependence of the current peaks proportional to the scan rate increase (Fig. 5b). As shown in Fig. 5c, the current peaks were proportional to the square root of scan rate ($v^{1/2}$) with a correlation coefficient of 0.998 and 0.991, respectively as indicative of a diffusion-controlled process.

3.4. Optimization of the experimental conditions

The electrocatalytic mechanism of the peroxidase in presence of the H_2O_2 and phenolic compounds has already been reported [31,32]. The addition of H_2O_2 in presence of the hydroquinone produces quinone which is used to monitor the cTnT amount through peroxidase conjugated to the anti-cTnT. Here, the electrochemical reduction occurred in potentials close to 0V *versus* Ag/AgCl [33] and cathodic current peaks were measured at -0.05 V.

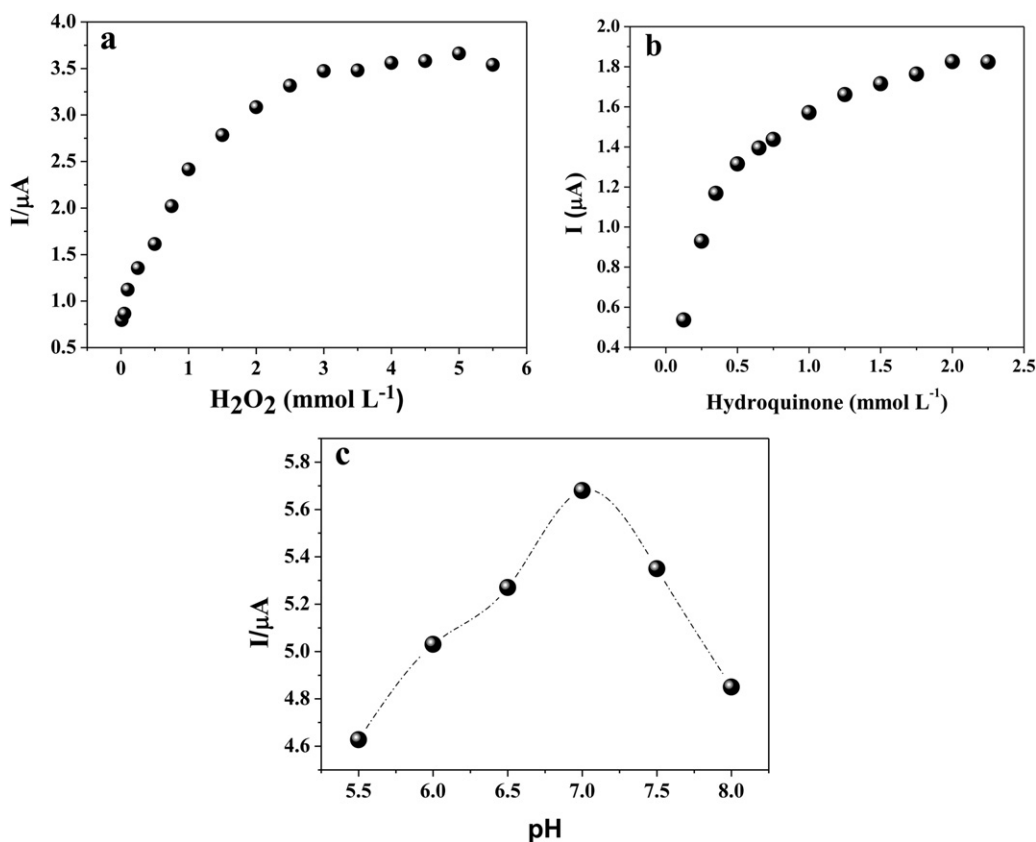


Fig. 6. (a) Influence of various H_2O_2 concentrations on the peak current response in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone. (b) Influence of hydroquinone concentrations on the peak current response in PB containing 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 . (c) Influence of pH value on the peak current response in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 .

In order to provide the best analytic performance of the immunosensor, the optimal concentration of H_2O_2 , hydroquinone and pH were investigated. Firstly, by fixing the hydroquinone concentration at 0.5 mmol L^{-1} , the optimal concentration of H_2O_2 (in 0.1 mol L^{-1} PBS at pH 7.0) was observed at 3.0 mmol L^{-1} H_2O_2 by plateau achieved (Fig. 6a), a typical behavior of a mediator-based sensor. The study of H_2O_2 concentration is very important for a good sensitivity and avoids the formation of inactive enzyme due to high concentration of peroxide [34]. Thus, 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 was selected to remaining studies. Secondly, by fixing the H_2O_2 at 1.0 mmol L^{-1} , the optimal concentration of hydroquinone mediator (at 0.1 mol L^{-1} PBS at pH 7.0) was selected at 0.5 mmol L^{-1} (Fig. 6b). The amount of electroactive species decurrent from the reaction of the peroxidase enzyme conjugated to the antibody mediated by hydroquinone is strongly affected by pH changes [35]. To evaluate the optimal pH with maximal catalytic response, the pH was changed from 5.0 to 8.0 (PBS), fixing the hydroquinone and the H_2O_2 at 0.5 mmol L^{-1} and 1.0 mmol L^{-1} , respectively. The optimal pH was found at 7.0 (Fig. 6c).

3.5. Analytical response to the cTnT

The calibration curve for the immunosensor was conducted using all the optimized parameters at different concentrations of the cTnT prepared in PBS (0.05 ; 0.1 ; 0.25 ; 0.5 ; 1.0 ; 2.5 ; 5.0 ; 7.5 ; 10.0 ng mL^{-1}) (Fig. 7). The data were processed in Origin 7 software (Microcal) showing a linear increase of current response proportional to the concentrations of cTnT according to equation $Y = 0.261 + 1.031X$ (Fig. 7, inset). The linear range was obtained between 0.05 and 5.0 ng mL^{-1} cTnT. The immunosensor showed a

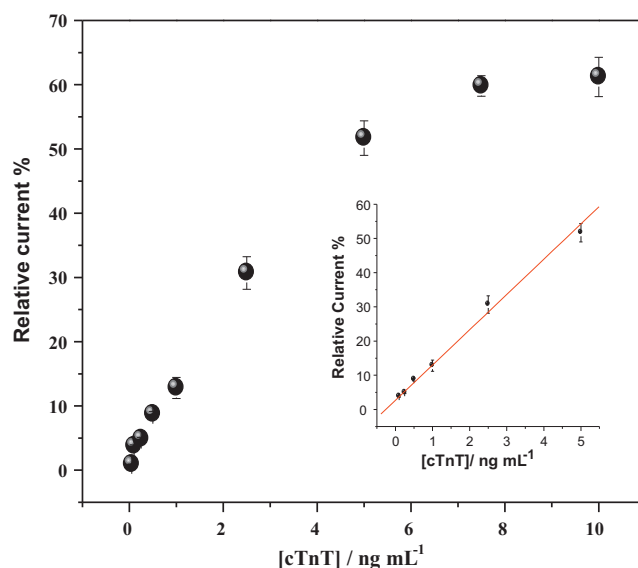


Fig. 7. Calibration curve of the poly(o-ABA) modified immunosensor for samples of cTnT in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 . The inset represents the linear fit of the calibration plot with correlation coefficient of 0.992 ($p < 0.0001$), $Y = 0.263 + 1.011X$.

high correlation coefficient (0.992 , $p \ll 0.01$) and the limit of detection was found to be 0.016 ng mL^{-1} cTnT. The limit of detection (LOD) was estimated according to the $3\sigma_{\text{blank}}/S$ criteria, where S , indicating the method calibration sensitivity, is the slope of the linear calibration plot, and σ_{blank} is the deviation ($n = 10$) of the

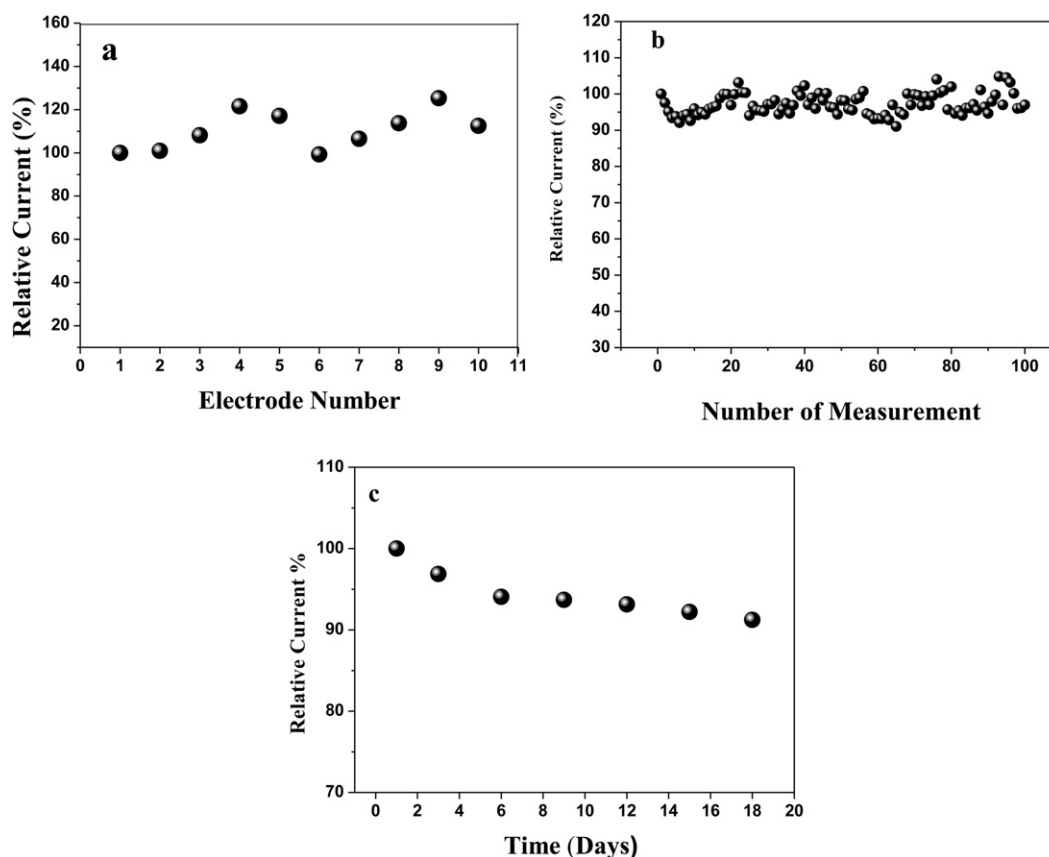


Fig. 8. (a) Reproducibility study different electrodes ($n = 10$) prepared in the same conditions; (b) operational stability ($n = 100$); (c) lifetime of the immunosensor in 20 days (stored 4°C at 0.1 mol L^{-1} PBS). The cTnT sample (1.0 ng mL^{-1}) of the poly(o-ABA) modified electrode was measured by CVs in PBS containing 1.0 mmol L^{-1} H_2O_2 and 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone.

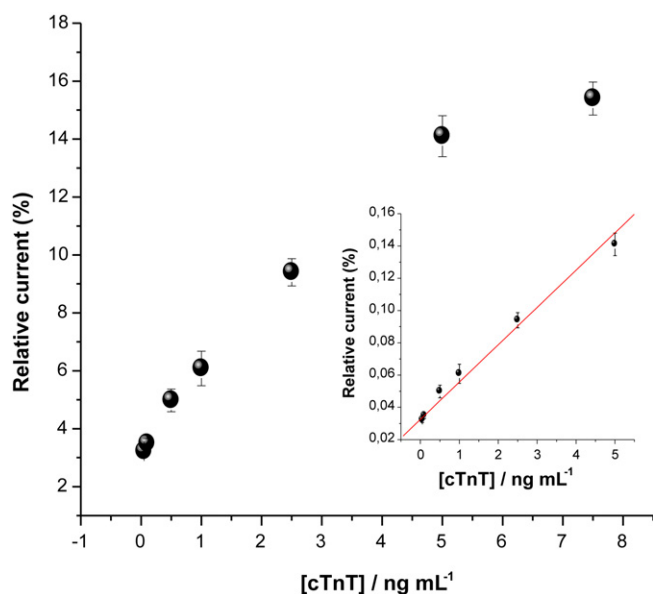


Fig. 9. Calibration curve of the poly(*o*-ABA) modified immunosensor for samples of cTnT in human serum. Current response obtained in PBS containing 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. The inset represents the linear fit of the calibration plot with correlation coefficient of 0.992 ($p < 0.0001$).

chronoamperometric signals obtained in the absence of the cTnT. The LOD is close to obtained by Ávila et al. (0.015 ng mL^{-1}) [36] and lower than previously described [12,15,37,38]. Taking in account that 0.1 ng mL^{-1} cTnT is the level clinically important to acute myocardial infarction detection, this immunosensor presents a LOD with satisfactory sensitivity.

3.6. Reproducibility, operational stability and lifetime of the immunosensor

A key problem in the use of immunosensors is the reproducibility of certain results and how long these devices can operate with a reliable and reproducible response [39]. Here, ten different electrodes were prepared under same conditions and submitted to the cTnT samples of 1.0 ng mL^{-1} . The results showed that this immunosensor reached an acceptable reproducibility with a relative standard deviation of 6.2% (Fig. 8a). Regarding operational stability, the immunosensor showed also significantly stable after 100 successive measurements performed each 2 min. It was obtained a relative standard deviation of approximately 3% (Fig. 8b). The lifetime study of the immunosensor was evaluated measuring the analytical responses of the electrodes within 18 days in each three days. The electrodes were stored at 4°C immersed in PBS solution. The current response values showed that the electrode retained 91.6% of the initial response after 18 days (Fig. 8c), indicating a good stability attributed to strong interaction between the poly(*o*-ABA) film and mAb-cTnT. All these measurements were carried using 0.5 mmol L^{-1} hydroquinone and $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ at PBS (0.1 mol L^{-1} , pH 7.0).

3.7. Determination of the cTnT in human serum

The human serum samples spiked with different cTnT concentrations (0.025 ; 0.05 ; 0.1 ; 0.5 ; 1.0 ; 2.5 ; 5.0 ; 7.5 ng mL^{-1}) were analyzed by chronoamperometry fixing the working potential at -0.05 V and response time of 120 s (Fig. 9). The immunosensor measurements showed a good agreement with the ECLIA methods at 95% confident level when paired *t*-test was applied (Table 2). As shown in Fig. 9 (inset), the calibration plot exhibited a good

Table 2

cTnT concentrations (ng mL^{-1}) from human serum samples by ECLIA and immunosensor methods.

ECLIA	Immunosensor ^a
0.05	0.03
0.11	0.12
0.50	0.67
1.01	1.20
2.52	2.63
5.02	4.67

^a Means of three replicates.

linear correlation between 0.05 and 5.0 ng mL^{-1} cTnT ($r = 0.992$, $n = 6$, $p < 0.001$), $Y = 0.0325 + 0.0231X$. The LOD was found to be 0.088 ng mL^{-1} cTnT taking account the slope of the calibration curve ($\text{LOD} = 3\sigma_{\text{blank}}/S$). The reduction of the LOD comparing to the cTnT spiked PBS samples can be attributed to the matrix effect, since the serum is a complex sample containing several interferents. Hence, this proposed immunosensor presents a good accuracy and sensitivity with a linear range clinically relevant for AMI diagnosis.

4. Conclusion

The poly(*o*-ABA) was successfully electropolymerized to the electrode surface and optimal parameters were determined by a factorial analysis. The homogenous film formed on the carbon electrode surface showed to be efficient for a covalent binding of the monoclonal antibodies against cardiac troponin T by an amide bond. This functionalized film of a polyaniline derivative acted as not only a matrix for protein immobilization but as also an excellent conductive film to promote an efficient electronic transfer. In regarding cTnT, the proposed immunosensor showed a high reproducibility and sensitivity for measurements at clinical levels significant for AMI diagnosis. Hence, the results show that this proposed immunosensor could be feasible to AMI diagnosis, although more assays with real samples yet need to be done before its clinical use.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) Brazil agency. A.B. Matos, PhD student is grateful to CAPES (Brazil) by scholarship during this work. The assistance of the PROCAPE (Cardiac Emergency of Pernambuco, Recife – PE, Brazil) is also acknowledged.

References

- [1] B. Lindahl, H. Toss, A. Siegbahn, P. Venge, L. Wallentin, F.S. Grp, Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 1139–1147.
- [2] M.S. Gotsman, S. Adler, Under what circumstances can an acute myocardial infarction be regarded as a work-related accident? Multi-causal diseases as work accidents, *Int. J. Soc. Secur. Work. Compensat.* 1 (2009) 21–32.
- [3] J.S. Alpert, K. Thygesen, E. Antman, J.P. Bassand, F. Apple, P.W. Armstrong, A.B. de Luna, G. Beller, G. Breithardt, B.R. Chaitman, P. Clemmensen, E. Falk, M.C. Fishbein, M. Galvani, A. Garson, C. Grines, C. Hamm, U. Hoppe, A. Jaffe, H. Katus, J. Kjekshus, W. Klein, P. Klotwijk, C. Lenfant, D. Levy, R.I. Levy, R. Luepker, F. Marcus, U. Naslund, M. Ohman, O. Pahlm, P. Poole-Wilson, R. Popp, J. Pyorala, J. Ravkilde, N. Rehnquist, W. Roberts, R. Roberts, J. Roelandt, L. Ryden, S. Sans, M.L. Simoons, H. Tunstall-Pedoe, R. Underwood, B.F. Uretsky, F. Van de Werf, L.M. Voipio-Pulkki, G. Wagner, L. Wallentin, W. Wijns, D. Wood, J.L.L. Sendon, M. Tendera, Myocardial infarction redefined – a consensus document of the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction, *C. J. Eur. Soc. Clin. Chem.* 47 (2001) 382–392.
- [4] L. Babuin, A.S. Jaffe, Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury, *Can. Med. Assoc. J.* 173 (2005) 1191–1202.
- [5] J.T. Martins, D.J. Li, L.B. Baskin, I. Jialal, J.H. Keffer, Comparison of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for the late diagnosis of myocardial injury, *Am. J. Clin. Pathol.* 106 (1996) 705–708.

- [6] M. Licka, R. Zimmermann, J. Zehelein, T.J. Dengler, H.A. Katus, W. Kubler, Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size, *Heart* 87 (2002) 520–524.
- [7] M. Panteghini, C. Cuccia, G. Bonetti, R. Giubbini, F. Pagani, E. Bonini, Single-point cardiac troponin T at coronary care unit discharge after myocardial infarction correlates with infarct size and ejection fraction, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1432–1436.
- [8] E. Lee-Lewandrowski, J.L. Januzzi, R. Grisson Jr., A.A. Mohammed, G. Lewandrowski, K. Lewandrowski, Evaluation of first-draw whole blood, point-of-care cardiac markers in the context of the universal definition of myocardial infarction a comparison of a multimarker panel to troponin alone and to testing in the central laboratory, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135 (2011) 459–463.
- [9] H.A. Katus, Development of the cardiac troponin T immunoassay, *Clin. Chem.* 54 (2008) 1576–1577.
- [10] S. Mayilo, M.A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T.A. Klar, A. Nichtl, K. Kuerzinger, F.D. Stefani, J. Feldmann, Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T, *Nano Lett.* 9 (2009) 4558–4563.
- [11] T. Lenderink, E. Boersma, C. Heeschen, A. Vahanian, M.J. de Boer, V. Umans, M. van den Brand, C.W. Hamm, M.L. Simoons, C. investigators, Elevated troponin T and C-reactive protein predict impaired outcome for 4 years in patients with refractory unstable angina, and troponin T predicts benefit of treatment with abciximab in combination with PTCA, *Eur. Heart J.* 24 (2003) 77–85.
- [12] B.V.M. Silva, I.T. Cavalcanti, A.B. Mattos, P. Moura, M.D.P.T. Sotomayor, R.F. Dutra, Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1062–1067.
- [13] E.A. de Vasconcelos, N.G. Peres, C.O. Pereira, V.L. da Silva, E.F. da Silva Jr., R.F. Dutra, Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 870–876.
- [14] F.T.C. Moreira, R.F. Dutra, J.P.C. Noronha, A.L. Cunha, M.G.F. Sales, Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: its use as sensory surfaces, *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 243–250.
- [15] R.F. Dutra, L.T. Kubota, An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl dextran-modified gold chip, *Clin. Chim. Acta* 376 (2007) 114–120.
- [16] C. Boozer, G. Kim, S. Cong, H. Guan, T. Londergan, Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 400–405.
- [17] K. Wong-ek, O. Chailapakul, N. Nuntawong, K. Jaruwongrungrsee, A. Tuantranont, Cardiac troponin T detection using polymers coated quartz crystal microbalance as a cost-effective immunosensor, *Biomed. Tech.* 55 (2010) 279–284.
- [18] A. Janshoff, C. Steinem, Label-free detection of protein–ligand interactions by the quartz crystal microbalance, *Methods Mol. Biol.* 305 (2005) 47–64.
- [19] A.J. Saleh Ahammad, Y.-H. Choi, K. Koh, J.-H. Kim, J.-J. Lee, M. Lee, Electrochemical detection of cardiac biomarker troponin I at gold nanoparticle-modified ITO electrode by using open circuit potential, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 1906–1916.
- [20] N.H. Kwon, M.A. Rahman, M.S. Won, Y.B. Shim, Lipid-bonded conducting polymer layers for a model biomembrane: application to superoxide biosensors, *Anal. Chem.* 78 (2006) 52–60.
- [21] M.A. Rahman, N.H. Kwon, M.S. Won, E.S. Choe, Y.S. Shim, Functionalized conducting polymer as an enzyme-immobilizing substrate: an amperometric glutamate microbiosensor for in vivo measurements, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4854–4860.
- [22] D.D. Borole, U.R. Kapadi, P.P. Mahulikar, D.G. Hundiware, Glucose oxidase electrodes of polyaniline, poly(o-anisidine) their co-polymer as a biosensor: a comparative study, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 4947–4953.
- [23] C. Mousty, B. Galland, S. Cosnier, Electrogeneration of a hydrophilic cross-linked polypyrrole film for enzyme electrode fabrication: application to the amperometric detection of glucose, *Electroanalysis* 13 (2001) 186–190.
- [24] H. Yao, Y. Sun, X. Lin, Y. Tang, L. Huang, Electrochemical characterization of poly(eryochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 6165–6171.
- [25] A. Berkkkan, A.I. Seckin, K. Pekmez, U. Tamer, Amperometric enzyme electrode for glucose determination based on poly(pyrrole-2-aminobenzoic acid), *J. Solid State Electrochem.* 14 (2010) 975–980.
- [26] G. Qian, C. Yang, W. Pu, J. Huang, J. Zhang, A novel polycatechol/platinum composite film prepared by electrochemical synthesis, *Synth. Met.* 157 (2007) 448–453.
- [27] R.E. Ionescu, C. Gondran, L. Bouffier, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier, Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 6228–6232.
- [28] A. Benyoucef, F. Huerta, M.I. Ferrahi, E. Morallon, Voltammetric and in situ FT-IRS study of the electropolymerization of o-aminobenzoic acid at gold and graphite carbon electrodes: influence of pH on the electrochemical behaviour of polymer films, *J. Electroanal. Chem.* 624 (2008) 245–250.
- [29] S. Tuncagil, D. Odaci, S. Varis, S. Timur, L. Toppare, Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, *Bioelectrochemistry* 76 (2009) 169–174.
- [30] H.F. Teh, H.Q. Gong, X.D. Dong, X.T. Zeng, A.L.K. Tan, X.H. Yang, S.N. Tan, Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 23–29.
- [31] L. Chen, G. Zeng, Y. Zhang, L. Tang, D. Huang, C. Liu, Y. Pang, J. Luo, Trace detection of picloram using an electrochemical immunosensor based on three-dimensional gold nanoclusters, *Anal. Biochem.* 407 (2010) 172–179.
- [32] M. Eguilaz, M. Moreno-Guzman, S. Campuzano, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 517–522.
- [33] L.D. Mello, M. Sotomayor, L.T. Kubota, HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract, *Sens. Actuators B: Chem.* 96 (2003) 636–645.
- [34] S.A. Adediran, Kinetics of the formation of p-670 and of the decay of compound III of horseradish peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996) 279–284.
- [35] H. Yang, R. Yuan, Y. Chai, L. Mao, H. Su, W. Jiang, M. Liang, Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification, *Biochem. Eng. J.* 56 (2011) 116–124.
- [36] B.E.-F. de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, Disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of troponin T cardiac marker, *Electroanalysis*, in press.
- [37] R.F. Dutra, R.K. Mendes, V.L. Silva, L.T. Kubota, Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1744–1750.
- [38] K. Wong-ek, O. Chailapakul, N. Nuntawong, K. Jaruwongrungrsee, A. Tuantranont, Cardiac troponin T detection using polymers coated quartz crystal microbalance as a cost-effective immunosensor, *Biomed. Eng.* 55 (2010) 279–284.
- [39] N. Bojorge Ramirez, A.M. Salgado, B. Valdman, The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives, *Braz. J. Chem. Eng.* 26 (2009) 227–249.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos dois tipos de imunossensores para troponina T para diagnóstico do IAM.

O primeiro imunossensor eletroquímico proposto para detecção de TnT foi baseado na tecnologia de eletrodos impressos. A modificação eletródica com NTCs amino-funcionalizados foi desenvolvida por não requerer demoradas e dispendiosas etapas de reações e não necessitar de processos estritamente controlados. As condições experimentais foram otimizadas utilizando uma análise fatorial e demonstrou que o tempo de protonação e concentração da etilenodiamina (EDC) foram limitantes para alcançar com sucesso a funcionalização dos NTCs. Sob condições experimentais otimizadas, uma curva de calibração para as diferentes concentrações de TnT foi obtida com faixa linear de resposta entre 0,02 e 0,32 ng mL⁻¹ ($r=0,985$, $n=5$, $p<0.001$) e um limite de detecção de 0,016 ng mL⁻¹. Este imunossensor mostrou-se adequado para uma monitoração *in loco* utilizando um tip sensor.

O segundo imunossensor eletroquímico proposto foi baseado na formação de um filme polimérico sobre o eletrodo de carbono vítreo. O ácido orto-aminobenzóico (*o*-ABA) foi eletropolimerizado sobre a superfície do eletrodo e permitiu a exposição de grupamentos carboxilícos para ligar o anti-TnT. Uma análise fatorial foi realizada e demonstrou que a velocidade de varredura e a concentração de H₂SO₄ foram limitantes para o processo de eletropolimerização. Apresentou parâmetros de sensibilidade e especificidade diagnóstica comparáveis aos testes de enzimaímunoensaio (ELISA) e eletroquimioluminescência (ECLIA). O imunossensor apresentou-se estável mantendo 91,6% da sua resposta inicial após 18 dias e apresentou um limite de detecção de 0,015 ng mL⁻¹ de TnT.

Estes trabalhos desenvolveram imunossensores confiáveis para detecção da TnT. No entanto, novos estudos ainda precisam ser realizados para utilização desses dispositivos na

prática clínica com uma validação mais ampla e a possibilidade de detecção em sangue total, ao invés de soro.

7. REFERÊNCIAS

ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A. Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini-Review. **Electromagnetics**, 28: 214-242, 2008.

ACHAR, S.A.; KUNDU, S.; NORCROSS, W.A. Diagnosis of acute coronary syndrome. **American Family Physician**, 72:119-126, 2005.

AIZAWA, M., Principles and applications of electrochemical and optical biosensors, **Analytical Chimica Acta**, 250:249-256, 1991.

ALPERT, J.S.; THYGESEN, K.; ANTMAN, E.; BASSAND, J.P. Myocardial infarction redefined-a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, 36:959-969, 2000.

ANDERSON, J.L.; ADAMS, C.D.; ANTMAN, E.M.; BRIDGES, C.R.; CALIFF, R.M.; CASEY, D.E.JR; CHAVEY, W.E.; FESMIRE, F.M.; HOCHMAN, J.S.; LEVIN, T.N.; LINCOFF, M.; PETERSON, E.D.; THEROUX, P.; WENGER, N.K.; WRIGHT, S.; SMITH, S.C.; JACOBS, A.K.; ADAMS, C.D.; ANDERSON, J.L.; ANTMAN, E.M.; HALPERIN, J.L.; HUNT, S.A.; KRUMHOLZ, H.M.; LYTLE, B.W.; NISHIMURA, R.; ORNATO, J.P.; PAGE, R.L.; RIEGEL, B. American college of cardiology; American heart association task force on practice guidelines, committee to revise the 2002 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, 50:1-157, 2007.

ANTMAN, E.M.; HAND, M.; ARMSTRONG, P.W.; BATES, E.R.; GREEN, L.A.; HALASYAMANI, L.K.; HOCHMAN, J.S.; KRUMHOLZ, H.M.; LAMAS, G.A.; MULLANY, C.J.; PEARLE, D.L.; SLOAN, M.A.; SMITH, S.C. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circulation**, 117:296-329, 2008.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 23: 1083-1100, 2008.

BABUIN, L.; JAFFE, A.S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **Canadian Medical Association Journal**. 173:1191-1202, 2005.

BACKMANN, N.; ZAHND, C.; HUBER, F.; BIETSCH, A.; PLÜCKTHUN, A.; LANG, H.-P.; GÜNTHERODT, H.-J.; HEGNER, M.; GERBER, C. A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102: 14587-14592, 2005.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**, 1: 180-192, 2005.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2ª edição. **New York: Ed. Wiley India**, 2006, 827p.

BASSAN, R.; PIMENTA, L.; LEÃES, P. E.; TIMERMAN, A. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. Definição de graus de recomendação e níveis de evidência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 76: 1-22, 2002.

BERGAMINI, M.F.; OLIVEIRA, F.C.M.; ZANONI, M.V.B. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. **Eclética Química**, 30:53-59, 2005.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications. **New York: Ed. Oxford University Press**, 1993, 464p.

BERTON, G.; PALATINI, P. Risk stratification after acute myocardial infarction: role of neurohormones, inflammatory markers and albumin excretion rate. **Italian Heart Journal**, 4: 295-304, 2003.

CAI, J.; CIZEK, K.; LONG, B.; MCAFERTY, K.; CAMPBELL, C.G.; ALLEE, D.R.; VOGT, B.D.; LA BELLE, J.; WANG, J. Flexible Thick-Film Electrochemical Sensors: Impact of Mechanical Bending and Stress on the Electrochemical Behavior. **Sensors and Actuators B Chemical**, 137: 379-385, 2009.

CAMERON, S.J.; SOKOLL, L.J.; LATERZA, O.F.; SHAH, S.; GREEN, G.B. A multi-marker approach for the prediction of adverse events in patients with acute coronary syndromes. **Clinica Chimica Acta**, 376:168-173, 2007.

CHAIKHOUNI, A.; AL-ZAIM, H. Troponin I Levels After Coronary Bypass Operations In Aleppo, Syria. **Heart Views**, 8:6-9, 2007.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 17:441-456, 2002.

CHRISTENSON, R.H.; AZZAZY, H.M. Cardiac point of care testing: a focused review of current National Academy of Clinical Biochemistry guidelines and measurement platforms. **Clinical Biochemistry**, 42: 150-157, 2009.

CLARK, R.J.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 334: 29-45, 1962.

COLLINSON, P.; GAZE, D. Cardiac troponins in intensive care. **Critical Care**, 9:345-346, 2005.

D'AMICO, A.; DI NATALE, C.; PAOLESSE, R.; MACAGNANO, A.; MANTINI, A. Metalloporphyrins as basic material for volatile sensitive sensors. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, 65:209-215, 2000.

DAUBERT, M.A.; JEREMIAS, A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. **Journal of Vascular Health and Risk Management**, 6: 691-699, 2010.

DROPSSENS. **Dropsens: Products Screen Printed Electrodes**. Disponível em: <http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

DU, Z.; LI, C.; LI, L.; ZHANG, M.; XU, S.; WANG, T. Simple fabrication of a sensitive hydrogen peroxide biosensor using enzymes immobilized in processable polyaniline nanofibers/chitosan film. **Materials Science and Engineering: C**, 29:1794-1797, 2009.

DUTRA, R.F.; KUBOTA, L.T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip, **Clinica Chimica Acta**, 376:114-120, 2007.

DUTRA, R.F.; MENDES, R.K.; SILVA, V.L.; KUBOTA, L.T. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer, **Journal of Pharmaceutical Biomedical and Analytical**, 43:1744-1750, 2007.

FANJUL-BOLADO, P.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; LAMAS-ARDISANA, P.J.; MARTÍN-PERNÍA, A.; COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. **Electrochimica Acta**, 53: 3635-3642, 2008.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, 29:137-142, 2006.

FREIRE R.S.; DURAN N.; KUBOTA L.T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, 54: 681-686, 2001.

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation. **Química Nova**, 27:980-985, 2004

GILL, N.D.; BEAVEN, C.M.; COOK, C. Effectiveness of post-match recovery strategies in rugby players. **British Journal of Sports Medicine**, 40:260-263, 2006.

GOMES, A.V.; GUZMAN, G.; ZHAO, J.; POTTER, J.D. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca^{2+} sensitivity and inhibition of force development. **The Journal of Biological Chemistry**, 277: 35341-35349, 2002.

GOMES-FILHO, S.L.R.; DIAS, A.C.M.S.; SILVA, M.M.S., SILVA, B.V.M.; DUTRA, R.F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, 29: 10-15, 2013.

GORNALL, D.D.; COLLYER, S.D.; HIGSON, S.P.J. Investigations into the use of screen-printed carbon electrodes as templates for electrochemical sensors and sonochemically fabricated microelectrode arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 141: 581-591, 2009.

GRECO, O.T. À procura de novos marcadores. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 27:153-158, 2005.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, 8:1400-1458, 2008.

HERKNER, H.; WALDENHOFER, U.; LAGGNER, A.N.; MULLNER, M.; OSCHATZ, E.; SPITZAUER, S.; GAMPER, G.; BUR, A.; HIRSCHL, M.M. Clinical application of rapid quantitative determination of cardiac troponin-t in an emergency department setting. **Resuscit**, 49: 259-264, 2001.

HIRSCH, A. Funktionalisierung von einwandigen Kohlenstoffnanoröhren. **Angewandte Chemie**, 114: 1933–1939, 2002.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª edição. **São Paulo: Ed. Bookman**, 2009, 1056p.

HOLMVANG, L.; LUSCHER, M.S. Very early risk stratification using combined ECG and biochemical assessment in patients with unstable coronary artery disease: a thrombin inhibition in myocardial ischemia (TRIM) substudy. **Circulation**, 98: 2004-2009, 1998.

IJIMA, S. Carbon nanotubes: past, present, and future. **Physica B**, 323: 1–5, 2002.

INZELT, G.; PINERI, M.; SCHULTZE, J.W.; VOROTYNTSE, M. A. Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. **Electrochimica Acta**. 45:2403-2421, 2000.

IOANNIDIS, J.P.; KARVOUNI, E.; KATRITSIS, D.G. Mortality risk conferred by small elevations of creatine kinase-MB isoenzyme after percutaneous coronary intervention. **Journal of the American College of Cardiology**, 42:1406-11, 2003.

IONESCU, R.E.; GONDRAN, C.; BOUFFIER, L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. **Electrochimica Acta**, 55:6228-6232, 2010.

JAFFE, A.S.; BABUIN, L.; APPLE, F.S. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. **Journal of the American College of Cardiology**, 48: 1-11, 2006.

JANSHOFF, A.; STEINEM, C. Label-free detection of protein-ligand interactions by the quartz crystal microbalance. **Methods in Molecular Biology**, 305: 47-64, 2005.

JUBETE, E.; LOAIZA, O.A.; OCHOTECO, E.; POMPOSO, J.A.; GRANDE, H.; RODRÍGUEZ, J. Nanotechnology: a tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors. **Journal of Sensors**, 1:1-13, 2009.

KARRAS, D.J.; KANE, D.L. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. **Emergency Medicine Clinics of North America**, 19:321-337, 2001.

KATUS, H.A.; REMPPIS, A.; LOOSER, S.; HALLERMEIER, K.; SCHEFFOLD, T.; KUBLER, W. Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 21: 1349–1353, 1989.

KRISHNAMOORTHY, S.; BEI, T.; ZOUMAKIS, E.; CHROUSOS, G. P.; ILIADIS, A.A. Morphological and binding properties of interleukin-6 on thin ZnO films grown on (100) silicon substrates for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, 22:707-714, 2006.

KUMAR, S.A.; CHEN, S.M. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. **Sensors** 8:739-766, 2008.

LEE, T.H.; GOLDMAN, L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. **Annals of Internal Medicine**, 105: 221-33, 1986.

LI, T.; YANG, M.; LI, H. Label-free electrochemical detection of cancer marker based on graphene–cobalt hexacyanoferrate nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 655: 50-55, 2011.

LICKA, M.; ZIMMERMANN, R.; ZEHELEIN, J.; DENGLER, T.J.; KATUS, H.A.; KÜBLER, W. Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size. **Heart**, 87:520-524, 2002.

LINDAHL, B.; TOSS, H.; SIEGBAHN, A.; VENGE, P.; WALLENTIN, L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, 343:1139–1147, 2000.

LIU, G.; LIN, Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. **Talanta**, 74:308-317, 2007.

LIU, Y.; ZHANG, W.; YU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, R.; SHANGGUAN, D.; LI, Y.; SHEN, B.; LIU, G. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between

human TNF- α and monoclonal antibodies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 99:416–424, 2004.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, 16:79-91, 2006.

LOPES, A.C. Síndromes Coronarianas Agudas. Tratado de Clínica Médica. 1ª ed. **Rio de Janeiro: Editora Roca**, 2006, 765p.

LOUZADA, E.S.; LUCCAS, P.O.; MAGALHÃES, C.S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, 11:52-56, 2004.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, 29:1318-1325, 2006.

LUO, X.L., MORRIN, A., KILLARD, A.J. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, 18:319-326, 2006.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, 26:492-500, 2008.

LUPPA, P.L.; SOKOLL, L.J.; CHAN, D.W. Immunosensors: principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, 314:1-26, 2001.

LYNAM, C.; GILMARTIN, N.; MINETT, A.I.; O’KENNEDY, R.; WALLACE, G. Carbon nanotube-based transducers for immunoassays. **Carbon**, 47: 2337-2343, 2009.

MANSUR P.H.G.; CURY, L.K.P.; DESTRO-FILHO, J.B.; RESENDE, E.S. DESTRO, J.P.B.; OLIVEIRA, L.M.; MORAES, D.C.G.; FREITAS, G.R.R.; ROCHA, L.S.S. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 87:106-114, 2006.

MARAZUELA, M.D.; MORENO-BONDI, M.C. Fiber optic biosensor: An Overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 372:664-683, 2002.

MATTOS, A.B.; FREITAS, T.A.; SILVA, V.L.; DUTRA, R.F. A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 161: 439-446, 2012.

MATTOS, A.B.; FREITAS, T.A.; KUBOTA, L.T.; DUTRA, R.F. An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum. **Biochemical Engineering Journal**, 71: 97– 104, 2013.

MEHRVAR, M; ABDI, M. Recent developments, characteristics and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical Sciences**, 20: 113-1126, 2004.

METTERS, J.P.; KADARA, R.O.; BANKS, C.E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **Analyst**, 136: 1067-76, 2011.

MORESCO, R.N.; XAVIER, L.S.; KAYSER, M.G.; BIRCK, A.; BECKER, R.P. Associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio **Revista Brasileira de análises clínicas**, 36:135-136, 2004.

MORROW, D.A.; CANNON, C.P.; JESSE, R.L.; NEWBY, L.K.; RAVKILDE, J.; STORROW, A.B.; WU, A.H.; CHRISTENSON, R.H. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. **Circulation**, 115: 356-75, 2007.

MOSCA, L. C-Reactive Protein – To Screen or Not to Screen? **New England Journal of Medicine**, 347:1615-1617, 2002.

MOTTA, V.T. Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações. 4.ed. **Porto Alegre: Editora Médica Missau**, 2003. 419 p.

NICOLAU, J.C.; TIMERMAN, A.; PIEGAS, L.S.; MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A.JR. Guidelines for unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction of the brazilian society of cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 89: 89-131, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS (World Health Organization). **Facts about cardiovascular diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/505/factsheets/fs317/en/index.html>. Acesso: 21 de janeiro de 2012.

PASCALE, R.; VILLARD, E.; CHARRON, P.; ISNARD, R. **The genetic bases of cardiomyopathies**. Journal American College Cardiology, 48: A79-A89, 2006.

PENG, X.; WONG, S.S. Functional Covalent Chemistry of Carbon Nanotube Surfaces. **Advanced Materials**, 21: 625–642, 2009.

PENTTILÄ, K.; KOUKKUNEN, H.; KEMPPAINEN, A.; HALINEN, M.; RANTANEN, T.; PYORALA, K.; PENTTILÄ, I. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 29: 93-101, 1999.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 25:1012-1021, 2002.

PESARO, A.E.P.; SERRANO JR., C.V.; NICOLAU, J.C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 50: 214-220, 2004.

PINACHOA, D.G.; GORGY, K.; COSNIER, S.; MARCO, M.P.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.J. Electrogenation of polymer films functionalized by fluoroquinolone models for the development of antibiotic immunosensor. **ITBM-RBM**, 29:181–186, 2008.

PLEBANI, M.; ZANINOTTO, M. Cardiac markers: present and future. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 29: 56-63, 1999.

- QIU, J.D.; LIANGA, R.P.; WANGA, R.; FANA, L.X.; CHENA, Y.W.; XIAB, X.H. A label-free amperometric immunosensor based on biocompatible conductive redox chitosan-ferrocene/gold nanoparticles matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, 25: 852–857, 2009.
- QURESHI, A.; KANG, W.P.; DAVIDSON, J.L.; GÜRBÜZ, Y. Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. **Diamond & Related Materials**, 18: 1401-1420, 2009.
- RAPP, B.E.; GRUHL, F.J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 398: 2403-2412, 2010.
- RICCARDI, C.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, 25:316-320, 2002.
- RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 21: 389-407, 2005.
- ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores Amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, 24: 77-86, 2001.
- ROY, S.; GAO, Z. Nanostructure-based electrical biosensors. **Nano Today**, 4: 318-334, 2009.
- SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, 24: 2749-2765, 2009.
- SANTALO, B.M.; GUINDO, S.J.; ORDONEZ, L.J. Biological Markers of Myocardial Necrosis. **Revista Española de Cardiología**, 56:703-720, 2003.
- SARKO, J.S.; POLLACK, J.R. Cardiac troponins. clinical laboratory in emergence medicine. **New England Journal of Medicine**, 23: 57–65, 2002.

SCIDA, K.; STEGE, P.W.; HABY, G.; MESSINA, G.A.; GARCIA, C.D. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: critical review. **Analytica Chimica Acta**, 691: 6-17, 2011.

SILVA, B.V.M.; CAVALCANTI, I.T.; MATTOS, A.B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.D.P.; DUTRA, R.F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 26: 1062-1067, 2010.

SILVA, B.V.M.; CAVALCANTI, I.T.; SILVA, M.M.S.; DUTRA, R.F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, 117: 431-437, 2013.

SHIAU, A.K.; MASSARI, M.E.; OZBAL, C.C. Back to basics: label-free technologies for small molecule screening. **Comb Chem High Throughput Screen**, 11: 231-237, 2008.

SRIWICHAI, S.; BABA, A.; PHANICHPHANT, S.; SHINBO, K.; KATO, K.; KANEKO, F. Electrochemically controlled surface plasmon resonance immunosensor for the detection of human immunoglobulin G on poly(3-aminobenzoic acid) ultrathin films. **Sensors and Actuators B: chemical**, 147:322-329, 2010.

STEEN, H.; GIANNITSIS, E.; FUTTERER, S.; MERTEN, C.; JUENGER, C.; KATUS, H. A. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. **Journal of the American College of Cardiology**, 48:2192-2194, 2006.

STEG, P.G.; GOLDEBERG, R.J.; GORE, J.M.; FOX, K.A.; EAGLE, K.A.; FLATHER, M. D.; SADIQ, I.; KASPER, R.; RUSHTON-MELLOR, S.K.; ANDERSON, F.A. Baseline characteristics, management practices, and in-hospital outcomes of patients hospitalized with acute coronary syndromes in the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). **American Journal of Cardiology**, 90:358-363, 2002.

STIEGLER, H.; FISCHER, Y.; VAZQUEZ-JIMENEZ, J.F.; GRAF, J.; FILZMAIER, K.; FAUSTEN, B.; JANSSENS, U.; GRESSNER, A.M.; KUNZ, D. Cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. **Clinical Chemistry**, 46:1338-1344, 2000.

TANG, A. The World Congress on Biosensors—Biosensors 2010. **Biosensors and Bioelectronics**, 26:1129–1130, 2010.

TAO, S.; LI, G.; YIN, J. Fluorescent nanofibrous membranes for trace detection of TNT vapor. **Journal of Materials Chemistry**, 17: 2730-2736, 2007.

TATE, J.R.; PANTEGHINI, M. Measurement of cardiac troponins revisited. **Biochimica Clinica**, 32: 535-546, 2008.

THUSU, R. **Strong growth predicted for biosensors Market**, 2010. Disponível em: <<http://www.sensorsmag.com/specialty-markets/medical/strong-growth-predicted-biosensors-market-7640>> Acesso em: 20 de maio de 2012.

TSOUTI, V.; BOUTOPOULOS, C.; ZERGIOTI, I.; CHATZANDROULIS, S. Capacitive microsystems for biological sensing. **Biosensor and Bioelectronics**, 27: 1-11, 2011.

TUNCAGIL, S.; ODACI, D.; VARIS, S.; TIMUR, S.; TOPPARE, L. Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing. **Bioelectrochemistry**, 76:169–174, 2009.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, 2011. **Department of Chemical Engineering and Biotechnology**, Disponível em: <<http://www.ceb.cam.ac.uk/pages/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles.html>> Acesso em: 20 de maio de 2012.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceutical. **Analytical Letters**, 40: 817-853, 2007.

VAISOCHEROVÁ, H.; FACA, V.M.; TAYLOR, A.D.; HANASH, S.; JIANG, S. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. **Biosensors and Bioelectronics**, 24: 2143-2148, 2009.

VASCONCELOS, E.A.; PERES, N.G.; PEREIRA, C.O.; SILVA, V.L.; SILVA JR., E.F.; DUTRA, R.F. Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 25: 870-876, 2009.

VELASCO-GARCIA, M.N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 20: 27-33, 2009.

WANG, C.C.; WANG, H.; WU, Z.Y.; CHEN, G.L.; YIU, R.Q. A piezoelectric immunoassay based on sel-assembly monolayer of cystamine polystyrene sulfonate for determination of Schistosoma japonicum antibodies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373:803-809, 2002.

WONG-EK, K.; CHAILAPAKUL, O.; NUNTAWONG, N.; JARUWONGRUNGSEE, K.; TUANTRANONT, A. Cardiac troponin T detection using polymers coated quartz crystal microbalance as a cost-effective immunosensor. **Biomedical Engineer**. 55: 279-284, 2010.

WU, A.H.; FENG, Y.J. Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. **European Heart Journal**, 19: 25-29, 1998.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 938-953, 2010.

YANG, W.; RATINAC, K.R.; RINGER, S.P.; THORDARSON, P.; GOODING, J.J.; BRAET, F. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 2114–2138, 2010.

YELLOW SPRING INSTRUMENT COMPANY. **Tecnology and environmental monitoring**. Disponível em: <<https://www.yei.com/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2012.

ZENZOR. **Zenzor Research & Development: Product.** Disponível em:<
<http://www.zensor.com.tw/product%20intro/product%20intro.htm>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

ZHANG, G.J.; CHUA, J.H.; CHEE, R.E.; AGARWAL, A.; WONG, S.M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 24: 2504-2508, 2009.

ZHANG, M.; MULLENS C.; GORSKI, W. Amperometric glutamate biosensor based on chitosan enzyme film. **Eletrochimica Acta**, 51:4528-4532, 2006.

ZHANG, X.; CUI, Y.; LV, Z.; LI, M.; MA, S.; CUI, Z.; KONG, Q. Carbon nanotubes, Conductive Carbon Black and Graphite Powder Based Paste Electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 6063 – 6073, 2011.

ZHAO, Y. L.; STODDART, J. F. Noncovalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, p. 1161-1171, 2009.