

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

Aptassensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca
T (cTnT), um marcador para infarto agudo do miocárdio

Sérgio Luiz da Rocha Gomes Filho

Recife – PE
2015

Sérgio Luiz da Rocha Gomes Filho

Aptassensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca T (cTnT),
um marcador para infarto agudo do miocárdio

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

Recife - PE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gomes Filho, Sérgio Luiz da Rocha
Aptassensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca T
(cTnT) um marcador para infarto agudo do miocárdio/ Sérgio Luiz da
Rocha Gomes Filho– Recife: O Autor, 2015.]

74 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientador: Rosa Amália Fireman Dutra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Biologia

Aplicada à Saúde, 2015.

Inclui bibliografia e anexo

1. Infarto do Miocárdio 2. Nanopartículas I. Carvalho Júnior, Luiz
Bezerra de (orientador) II. Dutra, Rosa Amália Fireman
(coorientadora) III. Título

616.1237

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-132

Sérgio Luiz da Rocha Gomes Filho

Aptassensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca T (cTnT),
um marcador para infarto agudo do miocárdio.

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2015, pela comissão examinadora.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (orientador)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Gustavo Alves do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Roberto Afonso da Silva

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Danielly Santos Campos Ferreira

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife - PE
2015

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, pelo amor e carinho durante todos os anos de minha vida. A minha esposa, pelo incentivo amoroso e constante e a minha filha pelo desejo de ser melhor sempre.

AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar, a **Deus** pela força dada durante todo caminho percorrido.*

*Ao professor e orientador **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**, pela amizade, orientação e paciência nesta minha fase do aprendizado.*

*À professora **Rosa Dutra**, pela co-orientação e aprendizado durante toda minha construção como pesquisador.*

*À minha amiga **Deborah Zanforlin** por me acompanhar durante os experimentos e por permanecer comigo durante todo o tempo me incentivando e apoiando quando algo dava errado.*

Aos meus colegas de laboratório que tanto me ajudaram e me apoiaram ao longo da confecção deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (**FACEPE**), pelo apoio financeiro.*

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) representa hoje um dos maiores problemas de saúde mundial prevalecendo sobre doenças como câncer, AIDS e doenças respiratórias. Em virtude da relevância, métodos cada vez mais eficientes para auxílio no diagnóstico do IAM vem sendo desenvolvidos. Um destes métodos, os aptassensores, chegam como ferramenta analítica alternativa para detecção de marcadores de necrose miocárdica. Neste trabalho um aptassensor simples e livre de marcação foi desenvolvido para detecção de troponina T cardíaca (cTnT), para isto, nanopartículas de prata foram sintetizadas eletroquimicamente sobre eletrodos impressos de tinta de carbono. Em seguida, 5 μL de cisteína foi adicionada à superfície sensora com intuito de servir de braço químico e possibilitar a imobilização do aptâmero. O aptâmero usado consiste em DNA fita simples modificado com grupos amino (NH_2 -ssDNA) e específico para o analito em questão. As condições ideais para imobilização do aptâmero e reconhecimento da molécula alvo, assim como a caracterização eletroquímica do aptassensor, foram investigados através das técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). A especificidade do aptassensor foi investigada utilizando para isso moléculas alvo específicas e inespecíficas. O reconhecimento do alvo apresentou alta sensibilidade com limite de detecção em $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de cTnT e uma boa reprodutibilidade ($\text{CV} = 4\%$). O sensor também foi testado com amostras de soro humano, apresentando ótima concordância (95% de nível de confiança) com o padrão ouro, o método ECLIA. Neste trabalho pôde-se constatar que as nanopartículas de prata incorporadas a superfície eletródica melhoraram a reprodutibilidade, a condutividade e, conseqüentemente a resposta sensora, enquanto os aptâmeros asseguraram a sensibilidade e especificidade do aptasensor, apresentando, este modelo, grande potencial para uso no monitoramento dos níveis séricos de troponina cardíaca.

Palavras-chave: Aptâmeros; Nanopartículas de prata; Troponina T Cardíaca e Infarto do miocárdio.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) it is one of the most serious diseases in the world responsible for approximately 17 million of deaths in 2012. Therefore, early diagnosis and prompt medical response are of paramount importance for patient survival. Aptasensors can be an alternative, which in combination with electrochemical techniques can provide the simplicity and speed required. A simple and sensitive label-free aptasensor for cardiac troponin T (cTnT) detection was successfully developed. For this purpose, it was chosen a DNA aptamers modified with amino group (NH₂-ssDNA) specific to bind cTnT with a high specificity and stability. Herein, silver nanoparticles electrochemically synthesized and cysteine were used to modify the electrode, providing binding sites for aptamer immobilization. The optimum conditions for immobilization of the aptamer and target recognition were investigated by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) technique. The aptasensor achieved a low limit of detection (0.3 ng mL^{-1}) and a linear range between 0.1 and 10 ng mL^{-1} cTnT, significant for acute myocardial infarction diagnosis. Good reproducibility was obtained by the proposed aptasensor supported by a coefficient of variation of 4%. The silver nanoparticles incorporated to the electrode surface improved the reproducibility, while the aptamer secured the sensitivity of the biosensor. The sensor was also tested for human serum samples presenting a good agreement with the ECLIA methods at 95% confident level. This point-of-care approach presents a great potential for use in several situations releasing the aptasensor for use in the cardiac troponin detection.

Keywords: Aptamer; Silver Nanoparticles, Cardiac Troponin T and Myocardial Infarction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As 20 principais causas de mortalidade global, dentre as doenças não transmissíveis.

(Adaptado de: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/11)

Figura 2. Desenho esquemático de um biossensor

Figura 3. Esquema da seleção de aptâmeros usando a tecnologia SELEX. (Adaptado de: MASCINI, M. Aptamer in bioanalysis. Itália: Universidade de Florença, 2009)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

CK - Creatina Quinase

CK-MB - Fração Miocárdica da Creatina Quinase

cTnI – Troponina I Cardíaca

cTnT - Troponina T Cardíaca

CV - Voltametria Cíclica

DPV - Voltametria de Pulso Diferencial

ECG - Eletrocardiograma

ECLIA – Imunoensaio de Electroquimioluminescência

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

LDH - Lactato Desidrogenase

MB - Azul de Metileno

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MYO - Mioglobina

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

QCM – Microbalança de Cristal de Quartzo

SELEX – Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial

SPR - Ressonância de Plásmon de Superfície

TGO - Transaminase Glutâmico Oxalacética

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	12
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Doenças Cardiovasculares.....	15
2.1.1	Epidemiologia.....	15
2.1.2	Fisiopatologia	16
2.1.3	Diagnóstico	16
2.2	Marcadores cardíacos.....	17
2.3	Troponinas	18
2.4	Biossensores	19
2.5	Aptâmeros como ferramenta diagnóstica.....	22
2.5.1	Características gerais	22
2.5.2	Vantagens.....	23
2.5.3	Aptassensores	24
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4.	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo Geral.....	36
4.2	Objetivos Específicos	36
	<i>PUBLICAÇÕES</i>	37
	CAPÍTULO I – Label-free aptasensor for sensitive detection of cardiac troponin using silver nanoparticles.	39
	Considerações Finais.....	65
	<i>ANEXO</i>	66

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) habitualmente conhecido como ataque cardíaco é uma das doenças mais graves do mundo com o número de mortes aumentando a cada ano e podendo atingir valores próximos à 23 milhões até 2030 (QURESHI; GURBUZ; NIAZI, 2012). Portanto, diagnóstico precoce e resposta médica imediata são de suma importância para a sobrevivência do paciente.

As diretrizes para o diagnóstico do IAM estão baseadas nos seguintes critérios: história clínica de dor torácica típica, elevação/depressão do segmento ST no eletrocardiograma (ECG) e um aumento dos marcadores de necrose cardíaca no exame de sangue (GOMES-FILHO et al., 2013; ZHANG et al., 2014). No passado, proteínas como a creatina quinase (CK-MB) e mioglobina (MYO) eram utilizadas como marcadores para o IAM, hoje em dia, moléculas mais específicas e sensíveis estão sendo selecionadas para este propósito. A Troponina T cardíaca (cTnT) é uma dessas moléculas, com elevada cardiospecificidade, seus valores de concentração no sangue aumentam rapidamente dentro de 3 a 4 horas após o início do IAM e podem manter-se elevados até 14 dias após o episódio agudo (SILVA et al., 2010). Por razões óbvias, os níveis séricos de cTnT têm sido utilizados como marcadores clínicos importantes para dimensionar o dano do miocárdio causados pelo infarto agudo (ASUMDA; CHASE, 2012; THYGESEN et al., 2000; WEI et al., 2003).

Algumas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na detecção de biomarcadores cardíacos, incluindo o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o ensaio eletroquimioluminescente (ECLIA), no entanto, esses métodos não são práticos, envolvem pessoal especializado e não podem ser facilmente miniaturizados. Como alternativa surgem os biossensores apresentando simplicidade, custo relativamente reduzido e capacidade de adaptação a sistemas portáteis, além de fornecerem, quando associados a técnicas eletroquímicas, especificidade e velocidade necessária para a detecção de moléculas em amostras sorológicas. (ZHAO et al., 2011).

Aptassensores são biossensores que empregam aptâmeros como elemento de reconhecimento biológico, os aptâmeros configuram-se como moléculas sintéticas de DNA ou RNA cadeia simples que podem se ligar a uma variedade de moléculas alvo com elevada especificidade e afinidade (MA et al., 2014; YAN; WANG; CHEN, 2011). Os aptassensores são ferramentas analíticas com elevada especificidade e sensibilidade, sendo utilizadas em diferentes abordagens para análise de diferentes moléculas (XIAO et al., 2012; XING et al., 2014).

Atualmente, têm-se observado muitas aplicações para o uso de aptâmeros na construção de biossensores. Entre os tópicos mais recorrentes estão: a detecção de adenosina, ocratoxina A e trombina humana. Entretanto não se verifica aptasensores voltados a detecção de biomarcadores cardíacos, em especial cTnT. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um aptassensor para troponina cardíaca utilizando eletrodos impressos de tinta de carbono, nesta abordagem nanopartículas de prata e o aptâmero específico para o analito em questão foram depositados na superfície do eletrodo. A estratégia visou a construção de um inovador, simples e rápido método para auxílio no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.

REVISÃO

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Cardiovasculares

2.1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares representam um dos maiores problemas de saúde da atualidade (QURESHI; GURBUZ; NIAZI, 2012). De acordo com a organização mundial de saúde (OMS), as doenças cardiovasculares sobressaem entre as maiores causas de mortalidade e são responsáveis por um terço dos óbitos no mundo. Os dados apontam que os valores de morte podem atingir a casa dos 23 milhões no ano de 2030, sendo 45% por doenças isquêmicas do coração e 31% por doenças cerebrovasculares (OPAS, 2003; WHO, 2014; YAGI, 2010).

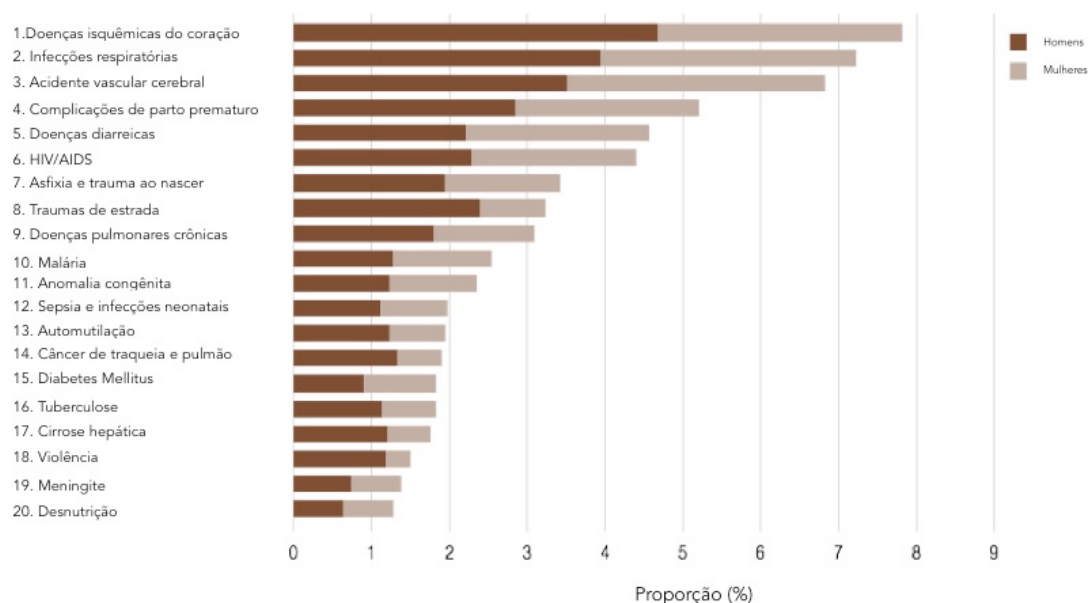


Figura 1. As 20 principais causas de mortalidade global, dentre as doenças não transmissíveis.

Adaptado de: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/

Para o Brasil o panorama não é diferente, 20% de todas as mortes em indivíduos acima dos 30 anos foram causadas por doenças cardiovasculares, o ministério da Saúde aponta que ocorreram 962.931 mortes só no ano de 2009 (DUNCAN et al., 2009; FAVARATO; MANSUR, 2011). Da mesma forma, em relação à morbidade hospitalar, as doenças do aparelho circulatório representam 10,8% das internações, destes, 30% possuem faixa etária superior a 60 anos. (YAGI, 2010). Apesar de ser ainda hoje uma das principais

causas de morte, as taxas vem caindo nas últimas décadas provavelmente em virtude de melhores prognósticos e da atenção dedicada a esses pacientes, salientado a necessidade de serviços e métodos de diagnóstico cada vez mais ágeis (FAVARATO; MANSUR, 2011; PESARO, 2004).

2.1.2 Fisiopatologia

O infarto agudo do miocárdio foi descrito pela primeira vez em 1912, considerada uma afecção isquêmica do miocárdio acarreta necrose geralmente secundária à redução do fluxo sanguíneo coronário de um seguimento do miocárdio. O coração apresenta um metabolismo anaeróbio limitado dependente de oxigênio para seu pleno funcionamento, durante o infarto agudo do miocárdio (IAM) o suprimento de oxigênio é interrompido e o ATP (adenosina trifosfato) não é mais produzido com o comprometimento da bomba de sódio e potássio e perda da integridade da membrana com morte da célula. Após o evento isquêmico inicial, uma intensa resposta inflamatória é observada, caracterizada principalmente por infiltração de neutrófilos seguidos por monócitos/macrófagos e linfócitos. A medida que essas células sanguíneas lideram os eventos inflamatórios ocorre intenso remodelamento do quadro, os linfócitos T e T-CD4 embora em pequeno número iniciam um papel chave para a resolução da inflamação (SEROPIAN et al., 2014). Entre os sintomas observáveis no IAM estão: dor visceral profunda subesternal intensa com uma sensação de pressão ou desconforto, irradiando-se para as costas, mandíbula ou membro superior esquerdo, acrescida de dispneia, fadiga entre outros.

2.1.3 Diagnóstico

Atualmente o IAM é diagnosticado com base na história clínica do paciente e confirmado pelo eletrocardiograma e alterações enzimáticas. Neste contexto o desenvolvimento de biomarcadores sorológicos mais específicos e sensíveis, assim como, técnicas de imagens mais específicas permitiram a determinação cada vez maior de necrose miocárdica. Os marcadores para necrose cardíaca sempre foram objetos de estudo e mudaram ao longo dos anos a medida que novos e mais específicos surgiam, foi assim com a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) quando substituída pela lactato desidrogenase (LDH) e mais tarde pela creatina quinase (CK) além da fração

MB da CK, isto é a CK-MB (THYGESEN; ALPERT; WHITE, 2007), atualmente o marcador preferencialmente utilizado, em virtude de sua especificidade, são as troponina cardíacas.

2.2 Marcadores cardíacos

Os biomarcadores cardíacos são considerados importantes componentes moleculares que servem como indicadores do IAM, e contribuem para o desempenho analítico dos ensaios rotineiramente utilizados em laboratórios e hospitais. Estes marcadores são descritos como elementos proteicos da estrutura celular que são detectados na circulação sanguínea quando ocorrem lesões no músculo cardíaco (HAMM et al., 1997; MURAKAMI, 2005; THYGESEN; ALPERT; WHITE, 2007; THYGESEN et al., 2000).

Os principais marcadores da injúria cardíaca, como mencionado acima, incluem a mioglobina, a fração MB da creatina quinase (CK-MB, do inglês chreatine kinase-myocardial band) e as troponinas cardíacas T e I (ACHAR; KUNDU; NORCROSS, 2005). No entanto, o uso de alguns desses biomarcadores cardíacos têm sido bastante discutido, já que esses podem ser encontrados em outros tecidos e estar elevados em respostas a determinadas doenças ou condições, conseqüentemente limitando a sua especificidade para o diagnóstico do IAM (GODOY; BRAILE; NETO, 1998).

A enzima citoplasmática creatina quinase é a proteína pioneira nos estudos sobre marcadores cardíacos (MORROW et al., 2001). Entretanto, esta proteína 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. Podendo estar em níveis aumentados em eventos não cardíacos como traumas, insuficiência renal, hipertermia e hipertireoidismo (ACHAR, KUNDU & NORCROSS, 2005).

Desde a descoberta da fração MB (CK-MB), a qual possui maior afinidade para o músculo cardíaco, esta isoenzima tem sido utilizada como marcador de escolha para detecção da recidiva de infartos após dezoito horas do evento inicial em dosagens repetidas de 6-12h dependendo do ensaio. Contudo não

oferece mecanismo para avaliação do tamanho da lesão (ACHAR; KUNDU; NORCROSS, 2005; KARRAS; KANE, 2001; MORROW et al., 2007).

Outro marcador, a mioglobina, é a principal proteína responsável pelo fornecimento do oxigênio ao músculo estriado. Essa proteína é liberada na corrente sanguínea por um período estimado de 1 hora após o dano no miocárdio, sendo considerada um marcador sensível nas primeiras horas do infarto. Por outro lado, a mioglobina também não é totalmente específica do tecido cardíaco, e os seus níveis podem estar relacionados com possíveis danos no músculo esquelético e a diminuição da função renal. Caso os níveis mioglobina forem considerados normais num período de 10 horas após o início das dores precordiais (dores no peito), há uma alta probabilidade do IAM ser desconsiderado (APPLE; WU; JAFFE, 2002; WU; YAN; JU, 2007). No entanto, este marcador deve ser sempre utilizado em associação com outros marcadores (BROGAN et al., 1994; OHMAN et al., 1990).

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade ao tecido cardíaco, as troponinas cardíacas (T e I) surgem como a ferramenta diagnóstica mais aconselhada, sendo considerada como o padrão “ouro” para a determinação da necrose do miocárdio (PANTEGHINI, 2002).

2.3 Troponinas

As troponinas são proteínas regulatórias que formam um complexo e permitem a interação cálcio-dependente da miosina com a actina. São constituídas de três diferentes subunidades (troponina I, C e T) existentes tanto no músculo esquelético quanto cardíaco e codificadas por diferentes genes. A troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como cardíaco e, por isso, não é usada clinicamente, mas os genes codificadores das troponinas I (cTnI) e T (cTnT), cardíaca e esquelética, são diferentes, reduzindo os casos de falso-positivos e facilitando o diagnóstico do IAM (MORROW et al., 2001).

Órgãos internacionais de pesquisas e associações de cardiologia (como exemplo a Sociedade Européia de Cardiologia) têm frequentemente recomendado o uso das cTnT e cTnI para a detecção específica da lesão do miocárdio (APPLE; WU; JAFFE, 2002). De acordo com (MURAKAMI, 2005), as

troponinas cardíacas são liberadas na corrente sanguínea e tornam-se mensuráveis num período compreendido de 2 a 8 horas após o infarto, e permanecem detectáveis em torno de 5 a 10 dias.

As medidas de troponinas têm valores prognósticos e são bastante úteis para a estratificação do risco quanto à presença de doenças cardíacas e com isso, direciona as decisões da terapia que devem ser tomadas (DUTRA; KUBOTA, 2007). Estas proteínas fornecem informações importantes na avaliação da extensão da lesão do miocárdio, o qual é estimado pelos valores quantificados entre 72-92 horas após o evento, apontando que a utilização de cTnT fornece informações fidedignas para uso no prognóstico e acompanhamento do indivíduo (BABUIN; JAFFE, 2005; LICKA et al., 2002; PANTEGHINI, 2002; STEEN et al., 2006).

Em virtude das características apresentadas, incluindo alta especificidade e sensibilidade, atualmente um número considerável de biossensores voltados ao diagnóstico do infarto do miocárdio baseiam-se no uso das troponinas cardíacas e tem sido desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa empregando os mais diversos métodos e técnicas (QURESHI; GURBUZ; NIAZI, 2012).

2.4 Biossensores

Nos últimos anos, tem-se tornado disponível no mercado um grande número de detectores portáteis que permitem a redução do tamanho da amostra e economia do tempo de análise. Os biossensores potencializaram o desenvolvimento de uma série de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade (GIBSON et al., 1992). Este gênero de detector permite realizar as mais variadas tarefas como: efetuar controle em linha a nível industrial, análise ambiental em tempo real, automatização de análises bioquímicas, análise in-vivo, detecção de substâncias biológicas relevantes, como hormônios e drogas (HE et al., 2007; ZHU et al., 2007). Geralmente o biossensor configura um método simples e de baixo custo, sem a necessidade de pré-tratamentos demorados e necessidade de grandes volumes de amostra. O seu uso, na maioria dos casos, não demanda de técnicos especializados

podendo em alguns casos dispensar o uso de reagentes, aparecendo tanto como aparelhos de uso contínuo, como descartáveis.

A área de diagnóstico clínico, como um todo, representa um mercado de grandes proporções, bem implementado e em contínua expansão. Neste âmbito encontra-se uma das maiores razões de sucesso e a maior área de aplicação dos biossensores. Estimou-se que o mercado global de biossensores e outros produtos bioeletrônicos cresceram de \$ 6.1 milhões de dólares em 2004 para \$ 8.2 milhões de dólares em 2009, tendo um crescimento anual médio da ordem de 6.3%. Os biossensores de glicose constituíram a quase totalidade das vendas em 2003, no entanto, as vendas de outros dispositivos bioeletrônicos estão em ascensão. Assim as aplicações às ciências biomédicas e às ciências da saúde dominam o mercado com 99% deixando a monitorização ambiental num distante segundo lugar.

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 constituem um tipo de sensor químico composto por um elemento biológico e um transdutor, capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas (D'ORAZIO, 2011; RODRIGUEZ-MOZAZ; LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2006). O elemento biológico é fixado (imobilizado) na superfície sensora do transdutor, que converte o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; ROSATTO et al., 2001). Este sinal pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, liberação ou captação de gases, de íons específicos, calor, massa, absorvância, condutância ou transferência de elétrons.



Figura 2. Desenho esquemático de um biossensor

Atualmente, a tecnologia dos biossensores tem sido desenvolvida para detecção de importantes moléculas, tais como patógenos e compostos tóxicos, 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 em vários grupos de acordo com o elemento 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 disso, microrganismos, células animais, células vegetais e cortes de tecidos também podem ser usados (VELASCO-GARCIA, 2009). De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores podem ser classificados em: eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos) (WU; YAN; JU, 2007), acústicos ou piezoelétricos - microbalança de cristal de quartzo, QCM, do inglês Quartz Crystal Microbalance (PAVEY; HUNTER; PAUL, 2003), ópticos (por fluorescência ou luminescência – ressonância de plásmen de superfície, SPR, do inglês Surface Plasmon Resonance) (TANG et al., 2006) e os calorimétricos (CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). 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 tipo 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)

2.5 Aptâmeros como ferramenta diagnóstica

2.5.1 Características gerais

Nos últimos anos uma nova estratégia vem sendo empregada, trata-se do uso de oligonucleotídeos sintéticos na construção de complexos ligantes capazes de interagir seletivamente com moléculas alvos (HU et al., 2014b). Esses complexos conhecidos como aptâmeros funcionam como “anticorpos químicos”, na realidade trata-se de moléculas de DNA ou RNA que ligam-se seletivamente a substratos orgânicos de baixo peso molecular, substratos inorgânicos ou a macromoléculas como as proteínas. Apresentam alta afinidade de ligação e alta especificidade de reconhecimento ao um alvo específico, a constante de afinidade aos seus substratos giram na faixa de micromolar a nanomolar (JENISON; GILL; POLISKY, 1990; WANG et al., 2014; YANG et al., 2014).

O interesse nos aptâmeros como agentes ligantes específicos surgiu como consequência da sua relativa facilidade de produção. Um processo de seleção evolutiva, conhecido como SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), elimina a necessidade de uma modelagem estrutural dos sítios receptores. Este processo inicia-se com a construção de uma biblioteca de ácidos nucleicos aleatória e linear, intercalada em uma sequência 5'e 3'de ácidos nucleicos previamente definidos. Um aptâmero de RNA envolve uma etapa adicional, a transcrição primária da biblioteca de DNA em RNA. Em seguida estes ácidos nucleicos passam por uma matriz de separação que inclui o substrato alvo. Os poucos ácidos nucleicos que revelam afinidade para o substrato ligam-se a matriz de separação enquanto a maioria dos componentes da biblioteca são lavados e eliminados. A eluição dos ácidos nucleicos ligados a matriz seguida por amplificação em PCR (reação em cadeia da polimerase)

leva a formação de uma mistura de ácidos nucleicos com afinidades variáveis para o alvo. A repetição do processo leva ao enriquecimento da mistura de ácidos nucleicos que revelam alta afinidade pelo substrato. Geralmente, com 8 a 15 ciclos de separação e amplificação observa-se a formação de aptâmeros com alta afinidade para um alvo específico (GOPINATH, 2007; MENCIN et al., 2014; WANG; JIA, 2009).

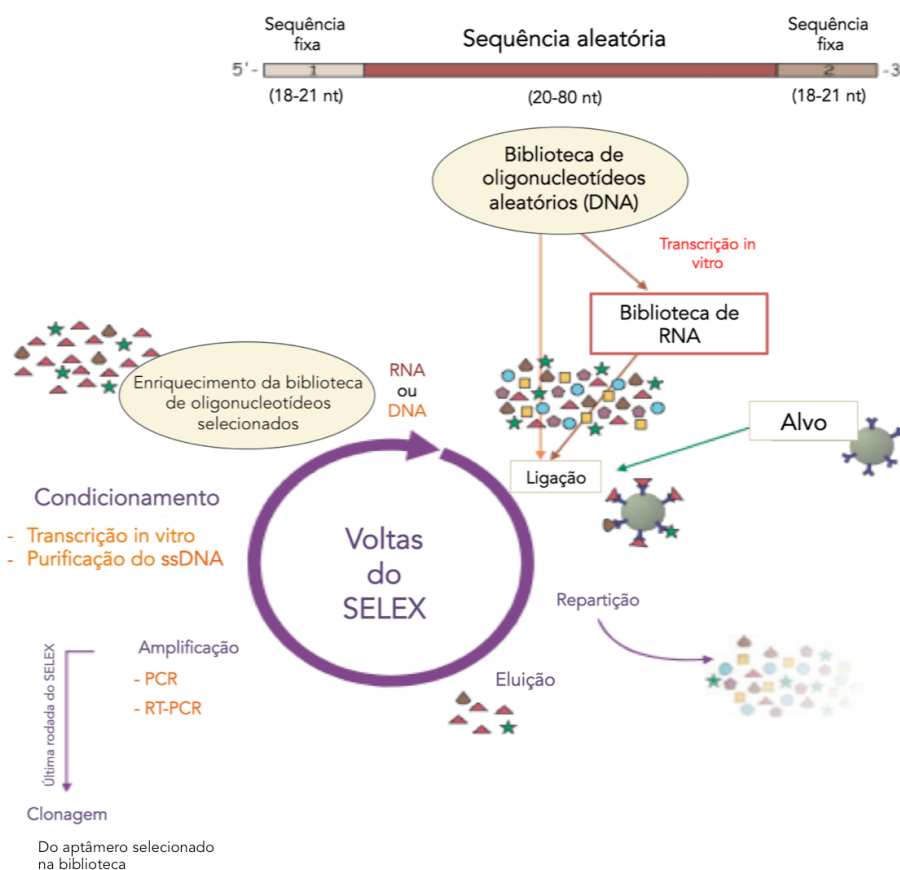


Figura 3. Esquema da seleção de aptâmeros usando a tecnologia SELEX. Adaptado de: MASCINI, M. Aptamer in bioanalysis. Itália: Universidade de Florença, 2009.

2.5.2 Vantagens

Quando comparados aos anticorpos, dispõem uma lista de vantagens apreciáveis na construção de métodos analíticos para sensoriamento de moléculas alvo. A seleção in vitro de aptâmeros elimina a necessidade da imunização de animais vivos, o qual é requerido na produção de anticorpos, isto permite a fabricação de aptâmeros específicos para compostos tóxicos. No

geral, são menores que anticorpos (massa molecular entre 5 e 15kDa) portanto, podem acessar regiões não alcançadas por imunoglobulinas. Sua modificação química com grupos funcionais permitem uma modelagem diferencial para diferentes tipos de transdutores, além de ser mais fácil de realizar do que em anticorpos. Outras características como, menores fenômenos de adsorção física e estabilidade térmica também são observados (JAYASENA, 1999; MASCINI, 2009) .

Em virtude das vantagens apresentadas, os aptâmeros tornaram-se um candidato ideal para uso na construção dos aptassensores. Estes, são biossensores que utilizam aptâmeros como molécula de reconhecimento biológico, estão baseados na interação aptâmero-analito, transformando a interação biológica em sinal elétrico passível de quantificação. Diferentemente do processo de hibridização observado para fitas de DNA/RNA, aptassensores voltados a captação de proteínas e/ou pequenas moléculas, comportam-se alterando sua cadeia de fita simples e flexível em estruturas tridimensionais bem definidas quando complexadas com seu devido substrato (JAYASENA, 1999). Este complexo formado permite a passagem de unidades redox entre a sonda e o eletrodo, produzindo a corrente que indicará a interação aptâmero-alvo (STREHLITZ; NIKOLAUS; STOLTENBURG, 2008).

2.5.3 Aptassensores

As estratégias empregadas para amplificação de sinal nos sensores biológicos vão além dos aptassensores, vários biossensores fazem uso de materiais diversos na tentativa de melhorar seus limites de detecção, sensibilidade e especificidade. A tendência atual direciona a utilização de polímeros condutores como polipirrol, polianilina, poli-L-lisina (LIU et al., 2012c; MIODEK et al., 2014; ZHU et al., 2012), além dos alótropos de carbono como nanotubos de carbono, nanofolhas de carbono, grafeno, grafeno oxidado entre outros (GUO et al., 2011; WANG et al., 2013), isto porque estes, apresentam a capacidade de melhorar a transferência eletrônica e consequentemente o sinal elétrico produzido. Já no campo dos aptassensores eletroquímicos as nanopartículas metálicas lideram o uso como marcadores dos processos de hibridização, aqui poderíamos citar os quantum dots e as nanopartículas

magnéticas como as de prata e ouro (CHEN et al., 2014b; LI et al., 2014; WANG et al., 2012), elas também funcionam aumentando a condutividade e servindo de amplificadores indiretos do sinal produzido na interação aptâmero-analito.

Aptameros podem ser imobilizados sobre suportes sólidos através de várias metodologias, em princípio esses métodos são similares aqueles já empregados na imobilização de moléculas de DNA (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000). Os métodos empregados para imobilização dos aptâmeros que são baseados na adsorção física, por meio das interações eletrostáticas, não são adequados devido a capacidade de dessorção do aptâmero da superfície, implicando em baixa estabilidade para o sensor. Os métodos mais adequados para tal objetivo são aqueles baseados na interação química de aptameros modificados com grupos tiol sobre superfícies metálicas ou aqueles baseados na interação biotina-avidina, para tal os aptameros marcados com biotina interagem fortemente com a avidina, imobilizada previamente em um suporte sólido.

Diversos ligantes contribuem para o processo de imobilização, entre eles destacam-se estruturas tridimensionais complexas, regulares e ramificada como os dendrímeros e nanotubos de carbono. Os dendrímeros já foram observados na construção de aptassensores como intermediários entre o aptâmero e a superfície do eletrodo. Muitos destes dendrímeros são sintetizados a base de poli(aminas), carregando em suas extremidades grupos terminais amino que podem ser utilizados na imobilização estável dos aptameros (MIODEK et al., 2014; YUAN et al., 2014). Princípio semelhante apresentam os nanotubos de carbono, a depender das modificações que estes possuem, sua utilização se faz bastante adequada mediando uma ligação estável entre os aptameros e a superfície, além de amplificar a resposta sensora (ZELADA-GUILLÉN et al., 2013; ZHOU et al., 2012).

A interação aptâmero-ligante pode ser detectada por ensaios convencionais baseados na marcação radioativa, cromatografia, eletroforese capilar entre outros, porém estes métodos tem sido revisados e adequados a realidade dos aptassensores. Na construção dos aptassensores o aptâmero é

imobilizado em uma superfície sólida e o sinal após a ligação do ligante, detectado por vários métodos eletroquímicos, acústicos e ópticos. Os métodos de detecção eletroquímicos são os mais utilizados e bastante eficazes por aliar relativa simplicidade e baixo custo, ainda mais eficientes quando fazem uso de mediadores redox, estes funcionam como indicadores eletroquímicos por apresentar um comportamento transitório de oxidação e redução em função da transferência de elétrons da superfície do eletrodo para a sonda redox (MERSAL, 2009; YOGESWARAN; CHEN, 2008).

Entre os mediadores eletroquímicos mais utilizados encontra-se o azul de metileno (MB), molécula de baixo peso molecular carregada positivamente que pode ser facilmente reduzido por dois elétrons à leucometileno, este processo pode ser monitorado facilmente por voltametria cíclica (CV) ou voltametria de pulso diferencial (DPV) e tem sido o princípio de muitos aptassensores desenvolvidos até o momento (CHEN et al., 2013; YANG et al., 2014). O azul de metileno (MB) apresenta a capacidade de se intercalar às moléculas de DNA através da interação com suas bases guaninas, a ausência do ligante permite com que o MB ligue-se com alta eficiência ao DNA produzindo um forte sinal eletroquímico, enquanto que a presença do ligante força a saída do indicador redox ou dificulta a interação do mesmo, produzindo um sinal conseqüentemente menor (BANG; CHO; KIM, 2005; KHEZRIAN et al., 2013).

Desde o surgimento do primeiro aptassensor diversas abordagens têm sido observadas, verificando-se nos últimos anos uma crescente nos tipos de transdutores empregados assim como nos tipos de analito investigados. Moléculas como adenosina e ocratoxina A são recorrentes nos trabalhos publicados (JIANG et al., 2014; PRABHAKAR; MATHARU; MALHOTRA, 2011; XING et al., 2012), mas sem dúvida, os aptassensores para trombina humana ganham destaque especial, grupos de pesquisa ao redor do mundo buscam a construção de sensores cada vez mais sensíveis visando a detecção rápida deste analito (SINHA et al., 2014). Entretanto, observa-se pouco empenho na construção de aptassensores voltados para o monitoramento de marcadores cardíacos e neste campo os imunossensores parecem dominar. Isto deve-se em parte à natureza da biomolécula analisada, como a maioria dos marcadores

utilizados até os dias de hoje são proteínas, a utilização de anticorpos específicos no monitoramento destes, se apresentam como alternativa de escolha.

A capacidade que os aptameros apresentam de se ligar a alvos específicos, incluindo proteínas, fornece uma alternativa na construção de biossensores voltados ao monitoramento dos indicadores de necrose cardíaca. Devido as suas características e vantagens sobre os anticorpos, os aptassensores são capazes de competir com os imunossensores na detecção de cTnT, atualmente o marcador mais utilizado devido a sua especificidade.

REFERÊNCIAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAR, S. A; KUNDU, S.; NORCROSS, W. A. Diagnosis of acute coronary syndrome. **American family physician**, v. 72, n. 1, p. 119–26, 1 jul. 2005.

APPLE, F. S.; WU, A. H. B.; JAFFE, A. S. 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**, v. 144, n. 6, p. 981–6, dez. 2002.

ASUMDA, F. Z.; CHASE, P. B. Nuclear cardiac troponin and tropomyosin are expressed early in cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v. 83, n. 3, p. 106–115, mar. 2012.

BABUIN, L.; JAFFE, A. S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury Luciano. v. 173, n. 10, p. 1191–1202, 2005.

BANG, G. S.; CHO, S.; KIM, B.-G. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 6, p. 863–70, 15 dez. 2005.

BROGAN, G. X. et al. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. **Annals of emergency medicine**, v. 24, n. 4, p. 665–71, out. 1994.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441–56, jun. 2002.

CHEN, J. R. et al. Probe-label-free electrochemical aptasensor based on methylene blue-anchored graphene oxide amplification. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 6, p. 861, 2013.

CHEN, Z. et al. A colorimetric aptamer biosensor based on cationic polymer and gold nanoparticles for the ultrasensitive detection of thrombin. **Biosensors & bioelectronics**, v. 56, p. 46–50, 15 jun. 2014.

D’ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 19-20, p. 1749–61, set. 2011.

DUNCAN, B. B. et al. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2009 e tendências de 1991 a 2009. n. 3, 2009.

DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 376, n. 1-2, p. 114–20, fev. 2007.

FAVARATO, D.; MANSUR, A. DE P. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Instituto do Coração (InCor) – HCFMUSP, São Paulo, SP - Brasil**, 2011.

GODOY, M. F. DE; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. A Troponina como Marcador de Injúria Celular Miocárdica. v. 71, n. nº 4, p. 629–633, 1998.

GOMES-FILHO, S. L. R. et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 10–15, jul. 2013.

GOPINATH, S. C. B. Methods developed for SELEX. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 1, p. 171–82, jan. 2007.

GUO, Z. et al. Single-walled carbon nanotubes based quenching of free FAM-aptamer for selective determination of ochratoxin A. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2517–2521, 15 out. 2011.

HAMM, C. W. et al. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 23, p. 1648–53, 4 dez. 1997.

HE, J.-B. et al. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. **Analytica chimica acta**, v. 585, n. 2, p. 337–43, 7 mar. 2007.

HU, R. et al. Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1. **Biosensors & bioelectronics**, v. 53, p. 384–9, 15 mar. 2014.

JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clinical chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1628–50, set. 1999.

JENISON, R.; GILL, S.; POLISKY, B. THAT DISCRIMINATE BETWEEN THEOPHYLLINE AND CAFFEINE. 1990.

JIANG, L. et al. Amplified impedimetric aptasensor based on gold nanoparticles covalently bound graphene sheet for the picomolar detection of ochratoxin A. **Analytica chimica acta**, v. 806, p. 128–35, 2 jan. 2014.

KARRAS, D. J.; KANE, D. L. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 321–37, maio 2001.

KHEZRIAN, S. et al. Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 43, p. 218–25, 15 maio 2013.

LI, J. et al. A non-aggregation colorimetric assay for thrombin based on catalytic properties of silver nanoparticles. **Analytica chimica acta**, v. 807, p. 120–5, 7 jan. 2014.

LICKA, M. et al. Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 87, n. 6, p. 520–4, jun. 2002.

LIU, S. et al. A novel label-free electrochemical aptasensor based on graphene-polyaniline composite film for dopamine determination. **Biosensors & bioelectronics**, v. 36, n. 1, p. 186–91, 2012.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 5, p. 492–500, 2008.

MA, X. et al. Aptamer-based portable biosensor for platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) with personal glucose meter readout. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 412–416, 15 maio 2014.

MASCINI, M. **Aptamers in Bioanalysis**. [s.l: s.n.].

MENCIN, N. et al. Optimization of SELEX: comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 91, p. 151–9, mar. 2014.

MERSAL, G. A. M. Electrochemical Sensor for Voltammetric Determination of Catechol Based on Screen Printed Graphite Electrode. v. 4, p. 1167–1177, 2009.

MIODEK, A et al. Electrochemical aptasensor of cellular prion protein based on modified polypyrrole with redox dendrimers. **Biosensors & bioelectronics**, v. 56, p. 104–11, 15 jun. 2014.

MORROW, D. A et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 115, n. 13, p. e356–75, 3 abr. 2007.

MORROW, D. A. et al. A simple risk index for rapid initial triage of patients with ST-elevation myocardial infarction : an InTIME II substudy. v. 358, p. 1571–1575, 2001.

MURAKAMI, F. S. A. M. M. Application of commercial calibrators for the analysis of immunosuppressant drugs in whole blood. **Clinical chemistry**, v. 51, n. 2, p. 457–60, fev. 2005.

OHMAN, E. M. et al. Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST elevation. **British heart journal**, v. 63, n. 6, p. 335–8, jun. 1990.

OPAS. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: Estratégia mundial sobre alimentação saudável , atividade física e saúde. 2003.

PANTEGHINI, M. The measurement of cardiac markers: where should we focus? **American journal of clinical pathology**, v. 118, n. 3, p. 354–61, set. 2002.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1349–1354, out. 2003.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. DE S.; KUBOTA, L. T. TENDÊNCIAS EM MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS AMPEROMÉTRICOS PARA APLICAÇÕES ELETROANALÍTICAS. v. 25, n. 6, p. 1012–1021, 2002.

PESARO, A. Infarto agudo do miocárdio-síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Rev. Associação medica ...**, v. 50, n. 2, 2004.

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors & bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 291–303, ago. 2000.

PRABHAKAR, N.; MATHARU, Z.; MALHOTRA, B. D. Polyaniline Langmuir-Blodgett film based aptasensor for ochratoxin A detection. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 10, p. 4006–11, 15 jun. 2011.

QURESHI, A.; GURBUZ, Y.; NIAZI, J. H. Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 171-172, p. 62–76, ago. 2012.

RICCARDI, C. DOS S.; COSTA, P. I. DA; YAMANAKA, H. IMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO. v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 386, n. 4, p. 1025–41, out. 2006.

ROSATTO, S. S. et al. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE AMBIENTAL. v. 24, n. 1, p. 77–86, 2001.

SEROPIAN, I. M. et al. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 16, p. 1593–603, 29 abr. 2014.

SILVA, B. V. M. et al. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 3, p. 1062–1067, 15 nov. 2010.

SINHA, B. et al. Planar Hall magnetoresistive aptasensor for thrombin detection. **Biosensors & bioelectronics**, v. 59, p. 140–4, 15 set. 2014.

STEEN, H. et al. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 11, p. 2192–4, 5 dez. 2006.

STREHLITZ, B.; NIKOLAUS, N.; STOLTENBURG, R. Protein Detection with Aptamer Biosensors. **Sensors**, v. 8, n. 7, p. 4296–4307, 23 jul. 2008.

TANG, J.-L. et al. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 119, n. 1, p. 105–109, nov. 2006.

THYGESEN, K. et al. Myocardial Infarction Redefined — A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction The Joint European Society of Cardiology / American College of Card. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 3, 2000.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. Universal definition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 22, p. 2173–95, 27 nov. 2007.

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**, v. 20, n. 1, p. 27–33, fev. 2009.

WANG, W.; JIA, L.-Y. Progress in Aptamer Screening Methods. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 454–460, mar. 2009.

WANG, X.-Y. et al. An electrochemiluminescence aptasensor for thrombin using graphene oxide to immobilize the aptamer and the intercalated [Formula: see text] probe. **Biosensors & bioelectronics**, v. 48, p. 120–5, 15 out. 2013.

WANG, Y. et al. A novel aptasensor based on silver nanoparticle enhanced fluorescence. **Biosensors & bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 76–81, 15 mar. 2012.

WANG, Y. et al. Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual backfillers. **Biosensors & bioelectronics**, v. 60, p. 218–23, 15 out. 2014.

WEI, J. et al. A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera. **Analytical Biochemistry**, v. 321, n. 2, p. 209–216, out. 2003.

WHO. **World health statistics 2014**. [s.l.: s.n.].

WU, L.; YAN, F.; JU, H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. **Journal of immunological methods**, v. 322, n. 1-2, p. 12–9, 30 abr. 2007.

XIAO, S. et al. Aptamer-based assay for prion diseases diagnostic. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, n. Icese 2011, p. 1348–1353, jan. 2012.

XING, H. et al. DNA Aptamer Technology for Personalized Medicine. **Current opinion in chemical engineering**, v. 4, p. 79–87, 1 maio 2014.

XING, X.-J. et al. Graphene oxide based fluorescent aptasensor for adenosine deaminase detection using adenosine as the substrate. **Biosensors & bioelectronics**, v. 37, n. 1, p. 61–7, 2012.

YAGI, M. C. N. DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM ADULTOS: FATORES DE RISCO E UTILIZAÇÃO DE SERVIÇOS PREVENTIVOS. 2010.

YAN, F.; WANG, F.; CHEN, Z. Aptamer-based electrochemical biosensor for label-free voltammetric detection of thrombin and adenosine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 1380–1385, dez. 2011.

YANG, X. et al. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on two-level cascaded signal amplification strategy. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, p. 7–13, abr. 2014.

YOGESWARAN, U.; CHEN, S. A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material. p. 290–313, 2008.

YUAN, Y. et al. A novel electrochemiluminescence aptasensor based on in situ generated proline and matrix polyamidoamine dendrimers as coreactants for signal amplification. **Biosensors & bioelectronics**, v. 55, p. 313–7, 15 maio 2014.

ZELADA-GUILLÉN, G. A et al. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 41, p. 366–71, 15 mar. 2013.

ZHANG, B. et al. Label-free detection of cardiac troponin I with a photonic crystal biosensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 58C, p. 107–113, 15 ago. 2014.

ZHAO, B. Y. et al. Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of kanamycin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 618–625, jul. 2011.

ZHOU, L. et al. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 201–208, fev. 2012.

ZHU, X. et al. Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1600–4, 15 mar. 2007.

ZHU, Y. et al. Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite. **Biosensors & bioelectronics**, v. 36, n. 1, p. 29–34, 2012.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um aptassensor eletroquímico para detecção rápida de troponina cardíaca T.

4.2 Objetivos Específicos

- Modificar o eletrodo de carbono com a finalidade de obter melhor estabilidade, reprodutibilidade e resposta amperométrica;
- Padronizar as modificações realizadas no eletrodo, permitindo a ligação do aptâmero à superfície de forma irreversível
- Caracterizar a superfície através do comportamento eletroquímico observado, assim como através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV)
- Testar a viabilidade do aptâmero quanto ao reconhecimento do elemento biológico
- Estabelecer a curva de calibração para identificação de níveis séricos de troponina
- Construir comparativos de especificidade com moléculas biológicas não específicas para o aptâmero utilizado.

PUBLICAÇÕES

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I – Label-free aptasensor for sensitive detection of cardiac troponin using silver nanoparticles.

A ser enviado à revista: Biosensor and Bioelectronics

Fator de impacto: 6.451

Label-free aptasensor for sensitive detection of cardiac troponin using silver nanoparticles.

Sérgio L. R. Gomes Filho^{1*}, Deborah M. L. Zanforlin¹, Mariana S. Arruda¹,
Gustavo A. Nascimento¹, José L. Lima-Filho^{1,2}, Rosa F. Dutra³, Luiz B.
Carvalho-Junior^{1,2}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

³ Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8000

e-mail addresses: rochagomesfilho@gmail.com (S. L. R. Gomes-Filho)

Abstract

A simple and sensitive label-free aptasensor for cardiac troponin T (cTnT) detection was successfully developed. For this purpose, it was chosen a DNA aptamers modified with amino group (NH₂-ssDNA) specific to bind cTnT with a high specificity and stability. Herein, silver nanoparticles electrochemically synthesized and cysteine were used to modify the electrode, providing binding sites for aptamer immobilization. The optimum conditions for

immobilization of the aptamer and target recognition were investigated by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) technique. The aptasensor achieved a low limit of detection (0.1 ng mL^{-1}) and a linear range between 0.1 and 10 ng mL^{-1} cTnT, significant for acute myocardial infarction diagnosis. Good reproducibility was obtained by the proposed aptasensor supported by a coefficient of variation of 4%. The silver nanoparticles incorporated to the electrode surface improved the reproducibility, while the aptamer secured the sensitivity of the biosensor. The sensor was also tested for human serum samples presenting a good agreement with the ECLIA methods at 95% confident level. This point-of-care approach presents a great potential for use in several situations releasing the aptasensor for use in the cardiac troponin detection.

Keywords: Aptamer; Silver Nanoparticles, Cardiac Troponin and Myocardial Infarction

1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) belongs to a group of heart disorders commonly known as heart attack. According to the World Health Organization (WHO) it is one of the most serious diseases in the world responsible for approximately 17 million of deaths in 2012 (Qureshi et al., 2012; WHO, 2014). It is known that the survival rate for patients hospitalized with AMI improves if treatment begins within 1 h after the heart attack (Zhang et al., 2014). Therefore, early diagnosis and prompt medical response are of paramount importance for patient survival.

The new guidelines for diagnosis of AMI are based on the following criteria: clinical history of ischemic chest discomfort, ST elevation/depression in electrocardiogram and a rise in blood testing of cardiac necrosis markers (Gomes-Filho et al., 2013). In the past, proteins such as creatine kinase (CK-MB) and myoglobin (MYO) were applied to evaluate the levels of cardiac injury. Nowadays molecules more specific and sensitive have been proposed. Cardiac Troponin T (cTnT) is one of these molecules with high cardiospecificity, essential for excitation–contraction coupling and regulation of cardiac output. When the heart cells are damaged their integrities are lost releasing cTnT into the bloodstream. The cTnT concentration in blood increases quickly within 3 to 4 h after onset of the AMI and could be elevated up to 14 days after the acute episode (Silva et al., 2010). These serum levels of cTnT have been important as clinical indicator for myocardial damage associated with the acute infarction (Asumda and Chase, 2012; Thygesen et al., 2000) .

Some methods have been used in the detection of cardiac biomarkers, including Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA). However, they involve several steps and qualified personnel hindering a rapid diagnostic in the cardiac emergence. Biosensors based on aptamer (aptasensors) can be an alternative, which in combination with electrochemical techniques can provide the simplicity and speed required. Including traditional advantages such as high-fidelity, adaptability to previous portable systems, and its possibility of becoming a point-of-care testing (Zhao et al., 2011).

Aptamers are synthesized single-stranded DNA (ssDNA) or RNA (ssRNA) oligonucleotides (typically <100mer) that can bind to a variety of target

molecules with high specificity and affinity. Their advantages also include stability and easy chemical modification allowing applications in different assays. The aptasensors applications have been proposed for different analytes, for instance, adenosine deaminase (ADA) (Hu et al., 2014); ultratrace of ochratoxin A (Chen et al., 2014) and human thrombin (Sinha et al., 2014), though, is not observed aptasensors focused in cardiac biomarker detection

Recently, many materials for aptamers immobilization have been reported such as on carbon nanotubes (e.g., single-, double-, and multi-walled); graphene oxide; carbon microfibers based on the principle of π - π stacking interaction between ssDNAs and especially gold and silver nanoparticles (Guo et al., 2011; Sheng et al., 2011; Yang et al., 2011), these has been widely used as biosensor support because they are easily synthesized; have large specific surface area; high chemical stability; favorable biocompatibility; good conductivity, and high affinity of binding to amine/thiol-containing molecules (Jiao et al., 2013).

Herein, to construct a cTnT aptasensor, the carbon paste electrodes screen-printed were electrochemically modified with silver nanoparticles and the aptamer was immobilized onto nanostructured surface. In order the aptamer allowed to recognize the human cTnT, providing sensibility and reliable response. Configuring it as an innovative electrochemical method for early diagnosis of myocardial infarction.

2. Experimental sections

2.1 Materials and reagents

Silver nitrate, Sodium citrate tribasic, Cysteine, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). The cTnT was obtained from Calbiochem (San Diego, USA) whereas Troponin DNA aptamer conjugated with 5'-primary amine (NH₂-ssDNA) from OTC biotech (Texas, USA). The aptamer was resuspended and dissolved in ultrapure water and kept at 23 °C (room temperature) for 24 hours. Ultrapure water (18 MΩ cm) used to prepare all solutions was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Inc., Billerica, USA).

The serum samples used in this work consisted of five samples from voluntary donors, kindly provided by Oswaldo Cruz Hospital of the Pernambuco University, according to the ethics committee's recommendations. The serum samples were collected from venous blood and immediately stored at - 20 °C.

2.2 Apparatus and measurements

The electrochemical analysis was carried out with an Autolab Potentiostat/Galvanostat (PGSTAT128N) that was equipped with NOVA (1.9) software. The voltammetry experiments were performed with screen-printed three-electrode system with a carbon working electrode (surface area of approximately 5 mm²), a carbon auxiliary electrode and an Ag/AgCl reference electrode. Differential pulse voltammetry (DPV) and the cyclic voltammetry (CV) method were used for the electrochemical signal analysis. The DPV measurement was performed in the Tris-HCl (20 mM, pH 7) buffer for methylene blue oxidation under the analysis following conditions: a potential

sweep between -0.8 and 0.0 V with a scan rate of 100 mVs⁻¹. The CV measurement was performed in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.137 M NaCl (PBS buffer) using the range potential between -0.8 and 1.0 V with scan rate of 100 mVs⁻¹.

2.3 Electrosynthesis of silver nanoparticles

The synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was carried out electrochemically onto the surface of the screen-printed electrode (SPE) aiming to increase the conductivity of system and to provide binding sites to aptamer immobilization on electrode surface, For this purpose 5 µl of aqueous solution containing 0.5 mM of silver nitrate and sodium citrate was added upon working electrode surface. The synthesis with cyclic voltammetry (CV) was performed employing a potential ranging from -0.5 to 0.0 V at scan rate of 100 mVs⁻¹ for 10 cycles.

2.4 Aptamer immobilization

The immobilization process occurred using cysteine as a chemical arm. For this purpose 5 µL of 10 mM cysteine were added to working electrode surface for 5 minutes and finally washed with ultrapure water. After that, it was employed the carbodiimide procedure to activate the carboxyl group of cysteine that was treated with coupling EDC-NHS for 15 minutes and immediately washed with ultrapure water. Finally, 5 µL of NH-ssDNA was added onto the working electrode surface for 15 minutes and washed ultrapure water yielding

the complex NH₂-ssDNA/AgNPs/SPE. An illustrative scheme of the aptasensor construction process is shown in Fig. 1. All incubations were performed at 23°C.

2.5 Aptasensor performance

The NH₂-ssDNA/AgNPs/SPEs aptasensors were incubated with 5 µL of cardiac troponin for 20 minutes followed by three-washings with ultrapure water. The electrochemical responses were obtained by methylene blue electrochemical reduction: 5 µL of methylene blue was dripped onto working surface for 5 minutes on the complex cTnT/NH₂-ssDNA/AgNPs/SPE under the following conditions: a potential sweep between -0.8 and 0.0 V with a scan rate of 100 mVs⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of silver nanoparticles

The morphology of the AgNP was analyzed by Scanning Electron Microscope (SEM) and can be seen in Fig. 2. The bare electrode presented a smooth surface (Fig. 2A), while in the Fig. 2B it is possible observed an irregular surface, this roughness represents the silver nanoparticles grown on the bare electrode. An improvement of the electrochemical signal and the stability of working area have described for silver nanoparticles (Kar et al., 2013).

The electrochemical synthesis of silver nanoparticles was performed in the presence of sodium citrate as stabilizer, which is necessary to protect the growth of the silver particles through aggregation. This approach does not

involve any harmful chemicals, or cumbersome treatments as well as does not involve external energy input. Herein, the difference of potential applied on the electrode was used as “reducing agent” promoting the reduction of silver ion and allowing the formation of nanoparticles, the scan range used possible to form a uniform and dense coverage, probably due to potential to more negative values clearly affects the rate of the nucleation process (Cheng et al., 2014; Khan et al., 2013; Siek et al., 2013)

Based on the Fig. 3, it was possible to observe the electrochemical behavior promoted by silver nanoparticles. The synthesis of AgNP on the electrode surface increased the value of currents peaks (Fig. 3A), while this peak is not observed in the bare electrode (Fig. 3B), this suggests that AgNPs improves the electron transfer between the metal ion and the electrode modified, promoting good electrochemical stability and contributing to the development of sensors more sensitive, stable and reproductive (Taleb et al., 2013)

3.2. *Electrochemical analysis of the aptasensor*

For analysis of the aptasensor, it was tested with regard to the recognition of their ligand, the cardiac troponin. For this, it was performed, the process of immobilization of the cardiac troponin T on the NH₂-ssDNA/AgNPs/SPE complex.

The process of immobilization of the NH₂-ssDNA onto AgNPs/SPE was achieved with assistance of the cysteine. The cysteine is a thiolated amino acid considered as a suitable agent for nanoparticles capping due to the presence of a thiol group (-SH), which have high affinity for binding to the

nanoparticle surface, and other free functional groups (-NH₂ and -COOH) that can be used for the immobilization of biomolecules (Upadhyay and Verma, 2014). Herein, the amino groups of the aptamer was able to establish a link with the cysteine carboxylic acid group, while the cysteine thiol group was bound to the silver nanoparticle surface via thiolated linkage, providing a covalent coupling strategy between AgNPs and the NH₂-ssDNA (Upadhyay and Verma, 2014; Zhang et al., 2013). The goal of this procedure was permit a stable connection of the aptamer upon the electrode surface, thereby ensuring the veracity of the sensor response.

In addition, it was used cyclic voltammetry (CV) to evaluate the electrochemical behavior of the working electrode (Fig. 4). The AgNP/SPE modified electrode presented a current peak at 90 μ A. The great current value obtained, occurred due to silver nanoparticles (Kar et al., 2013; Kashefi-Kheyraadi and Mehrgardi, 2012; Wang et al., 2012). After the immobilization of the aptamer, the current peak decreased because of the interaction between the Ag⁺ ions of the nanoparticles and the DNA bases of the aptamer (Basu et al., 2008; Hossain and Huq, 2002; Liu et al., 2012). The large number of negative phosphate groups present on the aptamer molecule, hinder the diffusion of negatively charged redox molecule toward surface, decreasing the electrochemical signal generated. (Dias et al., 2013; Liu et al., 2011; Shi et al., 2014).

It is also observed (Fig.4) that the peak potential shifted positively when the aptamer was immobilized, indicating that the aptamer was interspersed in the nanoparticles grid (Xu, 2007). The same behavior was seen with the

cysteine, although does not contribute effectively for an alteration of current peaks value.

Subsequent, it was tested the target capture experiments with the specific targets. The electrodes were evaluated using differential pulse voltammetry (DPV) by methylene blue electrochemical reduction. The DPV technique was used because it provides lower detection limits than the ones obtained by potentiometric stripping analysis and square wave voltammetry (Li et al., 2013). Methylene blue (MB), an aromatic heterocycle molecule, is often employed as an electrochemical “indicator”. The specific interaction of MB with DNA guanine bases enables the scanning on the aptamer surface, producing a large electrochemical signals when the aptamer is free, while the target interaction led to significant signal attenuation (Khezrian et al., 2013; Pan et al., 2007; Wang et al., 2010).

In figure 5, it is possible to observe that in DPV analysis, the NH₂-ssDNA/AgNP/SPE electrode presented current peak near 30 μ A. When the cTnT was bound to the aptamer immobilized, there was a decrease of the current peak to near 15 μ A, representing about 50% of reduction on the peak value observed. This is justified by the complex formed, analyte-aptamer, which interrupted the electron transfer process, indicated by the decrease of current peak of DPV signal in the presence of cTnT (Khezrian et al., 2013; Qin et al., 2012).

3.3 Optimization of the experimental conditions

Since the maximum loading amount directly influences the aptasensor sensitivity, the aptamer concentration of the sensing interface must be optimized. Different concentrations of aptamer (from 0.1 to 2 μM) prepared in ultrapure water were immobilized on the work electrode surface to evaluate the optimal concentration, for this, was used the cyclic voltammetry technique. The aptasensor response showed a maximal concentration at 1 μM aptamer, as a result of the aptamer-nanoparticles equilibrium required (Fig. supplementary 1). Thus, this concentration was chosen for the remaining experiments.

Immobilization time also exerts an important influence on the analytical performance of the aptasensor. Studies of the immobilization time effect (Fig. supplementary 2) were carried out with the electrode surface incubated in aptamer solution (1 μM) for 5, 15, 30, 45 and 60 minutes. The analytical response of the AgNP/SPE was evaluated by cyclic voltammetry technique, a greater immobilization was obtained at 15 minutes, which was chosen for subsequent experiments.

As the cyclic voltammetry analysis are based on decrease of the peak value, for represents a great amount of aptamer immobilized on the electrode surface, the current values in both figure supplementary are in current delta.

3.3. *Analytical response of the aptasensor*

Calibration curve was obtained by using the differential pulse voltammetry technique. The incubation with different concentrations of cTnT, was analyzed at potential sweep between -0.8 and 0.0 V, this potential involves monitoring of the electrochemical reduction signal of MB, which increases in the presence of DNA aptamer due to the interaction of MB with guanine bases. When cTnT is linked with aptamer the signal decreases. This reduction is attributed to the steric inhibition of the reducible groups of MB between the cTnT-aptamer complex. According to the Fig. 6, it is possible to observe that with decreasing concentration of the complementary target, there is a proportional decrement in the current delta value. A linear range between 0.1 and 10 ng mL⁻¹ cTnT was obtained, indicating a good analytical performance ($R^2 = 0.99558$, $n=5$, $p < 0.0001$) (Fig. 6). Limit of detection (LOD) calculated according to ANVISA was found to be approximately 0.1 ng mL⁻¹ cTnT. This aptasensor showed itself capable of evaluating cTnT in the range of the cardiac infarction myocardial based on the WHO criteria from the 1970s, which the cutoff value for cTnT is 0.1 ng mL⁻¹.

In order to test the specificity of the aptasensor, additional tests were conducted with non-complementary targets. The Fig. 7 shows that the signal generated through non-specific target is similar to the signal obtained with only the immobilized aptamer.

This fact occurred showing that the aptamer selected is really specific only for the cardiac troponin T and ensures the quality of the process of immobilization, thus proving the specificity of the biosensor. The reproducibility of the aptasensor response was evaluated by using six different electrodes incubated with 1 ng mL^{-1} cTnT, the best concentration shown above, obtaining an excellent reproducibility with coefficient of variation $CV= 4\%$.

3.4 Aptasensor response to the human serum samples

To accomplish the cTnT calibration plot in real samples, $5 \text{ }\mu\text{L}$ human serum was pipetted on the electrode surface and the electrochemical analysis were done. In order to prevent fluctuations on the electrochemical responses resulting from evaporation of samples, a moist chamber was used in all incubation procedures. The amount of cTnT in the serum samples was previously measured by a Roche Elecsys 2010 Immunoassay Analyzer, which is based on ECLIA method. The cTnT measurements of this aptasensor were performed with serum samples not diluted, the same, presenting a good agreement with the ECLIA methods at 95% confident level when the paired t-test was applied. As shown in Fig. 8, the calibration plot exhibited a good linear correlation between 1 and 5 ng mL^{-1} cTnT ($R^2 = 0.99363$, $n = 5$, $p < 0.0001$). This method has the advantage of being more practical, more easily portable and does not require chemical mediators to obtain the response.

4. Conclusions

A SPE specific to cardiac troponin T detection based on AgNPs was successfully developed. The designed aptasensor is a simple, efficient and sensitive method to detection cTnT as it was demonstrated. The incorporation of the AgNPs onto SPE surface promoted an increase of the electroactive area, an improved of the kinetic electron transfer, as well as an enhancing stability, while the aptamer provided the great reproducibility and sensitivity of the tip sensor. The sensor performance presented in this work emerges as a strategy suitable for the rapid, on-site and screen-out analysis of the cTnT. This technology is attractive for mass production, with the advantage of being relatively cheaper and more practical than others test like ECLIA and RT-PCR, opening new ways for an early diagnosis of the acute myocardial infarction.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)”. To the collaboration from “Centro de pesquisa Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ, to Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

References

- Asumda, F.Z., Chase, P.B., 2012. Nuclear cardiac troponin and tropomyosin are expressed early in cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Differentiation* 83, 106–115. doi:10.1016/j.diff.2011.10.002
- Basu, S., Jana, S., Pande, S., Pal, T., 2008. Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: assembly quantified through SPRS and SERS. *J. Colloid Interface Sci.* 321, 288–93. doi:10.1016/j.jcis.2008.02.015
- Chen, J., Zhang, X., Cai, S., Wu, D., Chen, M., Wang, S., Zhang, J., 2014. A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanocluster for ochratoxin A detection. *Biosens. Bioelectron.* 57, 226–31. doi:10.1016/j.bios.2014.02.001
- Cheng, K., Hung, Y., Chen, C., Liu, C., Young, J., 2014. Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: Characterization and surface modification. *Carbohydr. Polym.* 110, 195–202. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.053
- Dias, A.C.M.S., Gomes-Filho, S.L.R., Silva, M.M.S., Dutra, R.F., 2013. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. *Biosens. Bioelectron.* 44, 216–21. doi:10.1016/j.bios.2012.12.033
- Gomes-Filho, S.L.R., Dias, a. C.M.S., Silva, M.M.S., Silva, B.V.M., Dutra, R.F., 2013. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. *Microchem. J.* 109, 10–15. doi:10.1016/j.microc.2012.05.033
- Guo, Z., Ren, J., Wang, J., Wang, E., 2011. Single-walled carbon nanotubes based quenching of free FAM-aptamer for selective determination of ochratoxin A. *Talanta* 85, 2517–2521. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.015
- Hossain, Z., Huq, F., 2002. Studies on the interaction between Ag⁺ and DNA. *Talanta* 49, 398–404.
- Hu, K., Huang, Y., Wang, S., Zhao, S., 2014. A carbon nanotubes based fluorescent aptasensor for highly sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibitor screening in natural extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95, 164–8. doi:10.1016/j.jpba.2014.02.027
- Jiao, X.X., Chen, J.R., Zhang, X.Y., Luo, H.Q., Li, N.B., 2013. A chronocoulometric aptasensor based on gold nanoparticles as a signal amplification strategy for detection of thrombin. *Anal. Biochem.* 441, 95–100. doi:10.1016/j.ab.2013.07.023
- Kar, P., Tatard, F., Lamblin, G., Banet, P., Aubert, P.H., Plesse, C., Chevrot, C., 2013. Silver nanoparticles to improve electron transfer at interfaces of gold

- electrodes modified by biotin or avidin. *J. Electroanal. Chem.* 692, 17–25. doi:10.1016/j.jelechem.2012.12.020
- Kashefi-Kheyraadi, L., Mehrgardi, M. a, 2012. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical detection of adenosine triphosphate. *Biosens. Bioelectron.* 37, 94–8. doi:10.1016/j.bios.2012.04.045
- Khan, M.M., Ansari, S.A., Lee, J., Cho, M.H., 2013. Novel Ag@TiO₂ nanocomposite synthesized by electrochemically active biofilm for nonenzymatic hydrogen peroxide sensor. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33, 4692–9. doi:10.1016/j.msec.2013.07.028
- Khezrian, S., Salimi, A., Teymourian, H., Hallaj, R., 2013. Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* 43, 218–25. doi:10.1016/j.bios.2012.12.006
- Li, F., Peng, J., Wang, J., Tang, H., Tan, L., Xie, Q., Yao, S., 2013. Carbon nanotube-based label-free electrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-24. *Biosens. Bioelectron.* 54C, 158–164. doi:10.1016/j.bios.2013.10.061
- Liu, L., Liu, W., Hong, T., Weng, X., Zhai, Q., Zhou, X., 2012. Ag⁺ and cysteine detection by Ag⁺–guanine interaction based on graphene oxide and G-quadruplex DNA. *Anal. Methods* 4, 1935. doi:10.1039/c2ay25362c
- Liu, X., Li, W., Shen, Q., Nie, Z., Guo, M., Han, Y., Liu, W., Yao, S., 2011. The Ag⁺-G interaction inhibits the electrocatalytic oxidation of guanine--a novel mechanism for Ag⁺ detection. *Talanta* 85, 1603–8. doi:10.1016/j.talanta.2011.06.061
- Pan, D., Zuo, X., Wan, Y., Wang, L., Zhang, J., Song, S., Fan, C., 2007. Electrochemical Interrogation of Interactions between Surface-Confined DNA and Methylene BlueWord - s7112671.doc 2671–2680.
- Qin, H., Liu, J., Chen, C., Wang, J., Wang, E., 2012. An electrochemical aptasensor for chiral peptide detection using layer-by-layer assembly of polyelectrolyte-methylene blue/polyelectrolyte-graphene multilayer. *Anal. Chim. Acta* 712, 127–31. doi:10.1016/j.aca.2011.10.044
- Qureshi, A., Gurbuz, Y., Niazi, J.H., 2012. Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. *Sensors Actuators, B Chem.* 171-172, 62–76. doi:10.1016/j.snb.2012.05.077
- Sheng, L., Ren, J., Miao, Y., Wang, J., Wang, E., 2011. PVP-coated graphene oxide for selective determination of ochratoxin A via quenching fluorescence of free aptamer. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3494–3499. doi:10.1016/j.bios.2011.01.032

- Shi, A., Wang, J., Han, X., Fang, X., Zhang, Y., 2014. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal. *Sensors Actuators B Chem.* 200, 206–212. doi:10.1016/j.snb.2014.04.024
- Siek, M., Kaminska, A., Kelm, A., Rolinski, T., Holyst, R., Opallo, M., Niedziolka-Jonsson, J., 2013. Electrodeposition for preparation of efficient surface-enhanced Raman scattering-active silver nanoparticle substrates for neurotransmitter detection. *Electrochim. Acta* 89, 284–291. doi:10.1016/j.electacta.2012.11.037
- Silva, B.V.M., Cavalcanti, I.T., Mattos, A.B., Moura, P., Sotomayor, M.D.P.T., Dutra, R.F., 2010. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1062–1067. doi:10.1016/j.bios.2010.08.051
- Sinha, B., Ramulu, T.S., Kim, K.W., Venu, R., Lee, J.J., Kim, C.G., 2014. Planar Hall magnetoresistive aptasensor for thrombin detection. *Biosens. Bioelectron.* 59, 140–4. doi:10.1016/j.bios.2014.03.021
- Taleb, A., Yanpeng, X., Munteanu, S., Kanoufi, F., Dubot, P., 2013. Self-assembled thiolate functionalized gold nanoparticles template toward tailoring the morphology of electrochemically deposited silver nanostructure. *Electrochim. Acta* 88, 621–631. doi:10.1016/j.electacta.2012.10.034
- Thygesen, K., Alpert, J.S., Rydén, L., Garson, A., 2000. Myocardial Infarction Redefined — A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction The Joint European Society of Cardiology / American College of Card. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36.
- Upadhyay, L.S.B., Verma, N., 2014. Dual immobilization of biomolecule on the glass surface using cysteine as a bifunctional linker. *Process Biochem.* 3–7. doi:10.1016/j.procbio.2014.04.003
- Wang, J., Munir, A., Li, Z., Zhou, H.S., 2010. Aptamer-Au NPs conjugates-accumulated methylene blue for the sensitive electrochemical immunoassay of protein. *Talanta* 81, 63–7. doi:10.1016/j.talanta.2009.11.035
- Wang, Y., Li, Z., Li, H., Vuki, M., Xu, D., Chen, H.-Y., 2012. A novel aptasensor based on silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Biosens. Bioelectron.* 32, 76–81. doi:10.1016/j.bios.2011.11.030
- WHO, 2014. World health statistics 2014.
- Xu, B., 2007. Electrochemical and Spectroscopic Studies on the Interaction of Gallocyanine with DNA 917–924.

- Yang, T., Feng, Y., Zhang, W., Ma, S., Jiao, K., 2011. Synergistic membrane of ZrO₂/self-doped polyaniline nanofibres fabricated by controllable electrodeposition for DNA hybridization detection. *J. Electroanal. Chem.* 656, 140–146. doi:10.1016/j.jelechem.2010.12.013
- Zhang, B., Morales, A.W., Peterson, R., Tang, L., Ye, J.Y., 2014. Label-free detection of cardiac troponin I with a photonic crystal biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 58C, 107–113. doi:10.1016/j.bios.2014.02.057
- Zhang, Y., Yang, A., Zhang, X., Zhao, H., Li, X., Yuan, Z., 2013. Highly selective and sensitive biosensor for cysteine detection based on in situ synthesis of gold nanoparticles/graphene nanocomposites. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 436, 815–822. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.08.016
- Zhao, B.Y., Wei, Q., Xu, C., Li, H., Wu, D., Cai, Y., Mao, K., Cui, Z., Du, B., 2011. Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of kanamycin. *Sensors Actuators, B Chem.* 155, 618–625. doi:10.1016/j.snb.2011.01.019

Legends to Figures

Fig.1. Schematic diagram of the aptasensor in the successive steps. (a) Bare electrode, (b) Synthesis of silver nanoparticles, (c) Assembly of the cysteine film, (d) Activation via EDC/NHS, (e) Immobilization of Aptamer

Fig. 2. SEM images of the bare electrode (A) and nanostructured surface with silver nanoparticles (B). The a and b images with 6,000 magnification.

Fig. 3. Cyclic voltammograms of the sensor platform modified with silver nanoparticles (A), compared with bare electrode (B).

Fig. 4. Cyclic voltammograms profile of the screen-printed electrode with AgNPs (a), Cysteine/AgNP (b) and NH₂-ssDNA/Cysteine/AgNP (c). Scans performed in 0,2M of PBS buffer, pH7.4, at 100 mVs⁻¹ scan rate.

Fig. 5. Differential pulse voltammograms profile of the aptasensor without cTnT (A) and with cTnT (B). Scans performed in 20mM of Tris-HCl buffer, pH7, at 20 mVs⁻¹ scan rate.

Fig. 6. Calibration curve of the aptasensor. The measurement was performed in the Tris-HCl (20 mM, pH 7).

Fig. 7. Differential pulse voltammograms profile of the specificity test. Aptasensor without the target (a), aptasensor with non-specificity target (b) and Aptasensor with specificity target (cTnT) (c). Scans performed in 20mM of Tris-HCl buffer, pH7, at 20 mVs⁻¹ scan rate.

Fig. 8. Linear response of aptasensor to the serum samples in different concentrations of cTnT measured by ECLIA methods.

Fig. supplementary 1. Effect of the aptamer amount immobilized on the nanostructured surface in the aptasensor response measured

Fig. supplementary 2. Effect of the aptamer immobilization time on the nanostructured surface in the aptasensor response measured.

Figures

Fig. 1

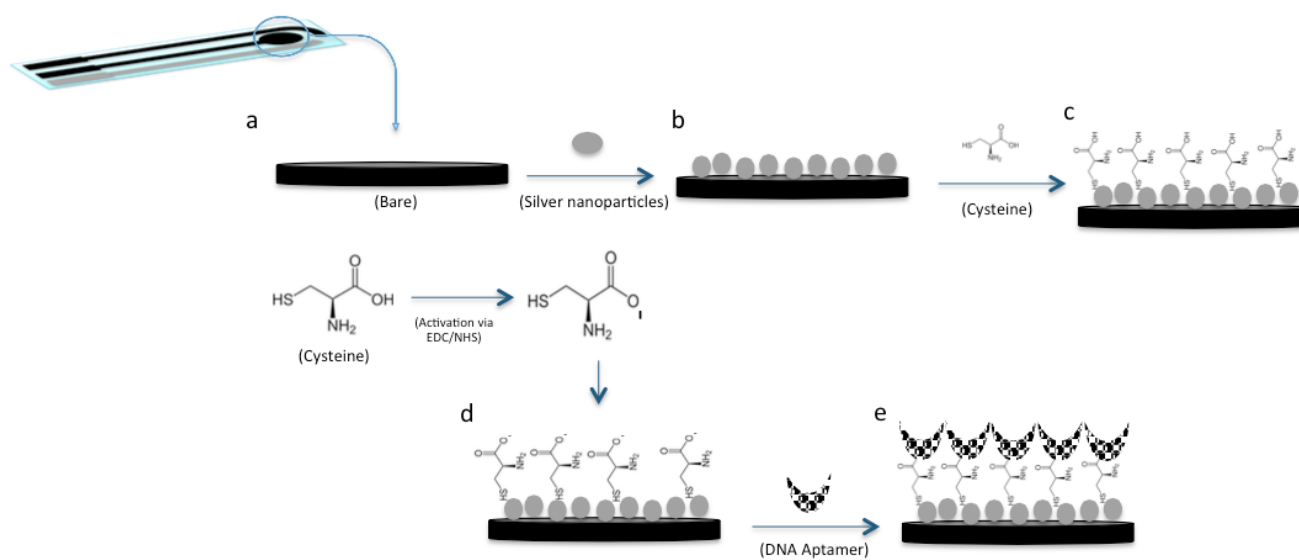


Fig. 2.

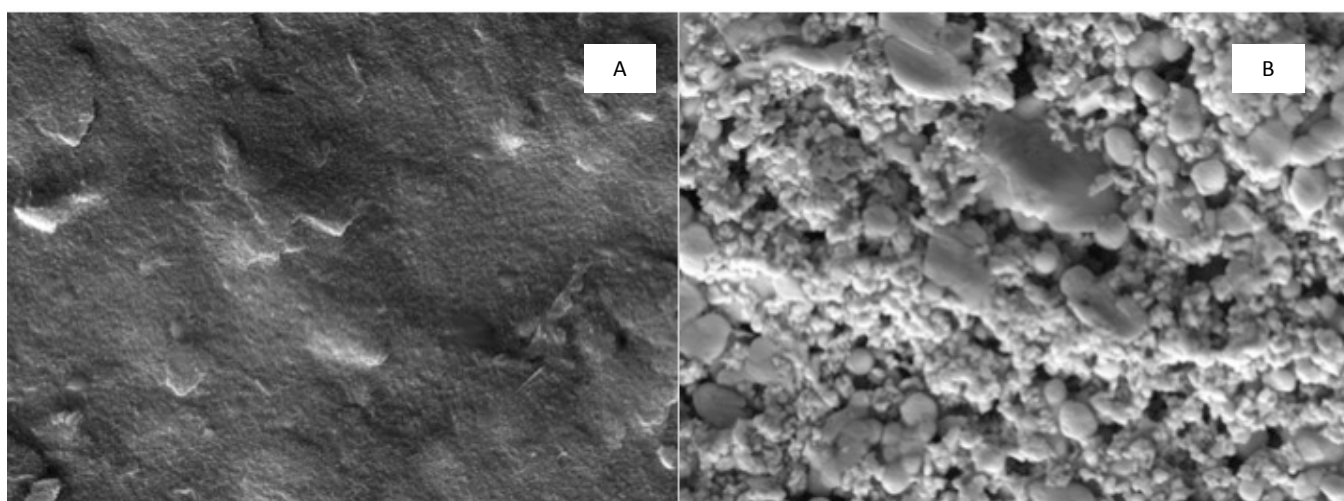


Fig. 3.

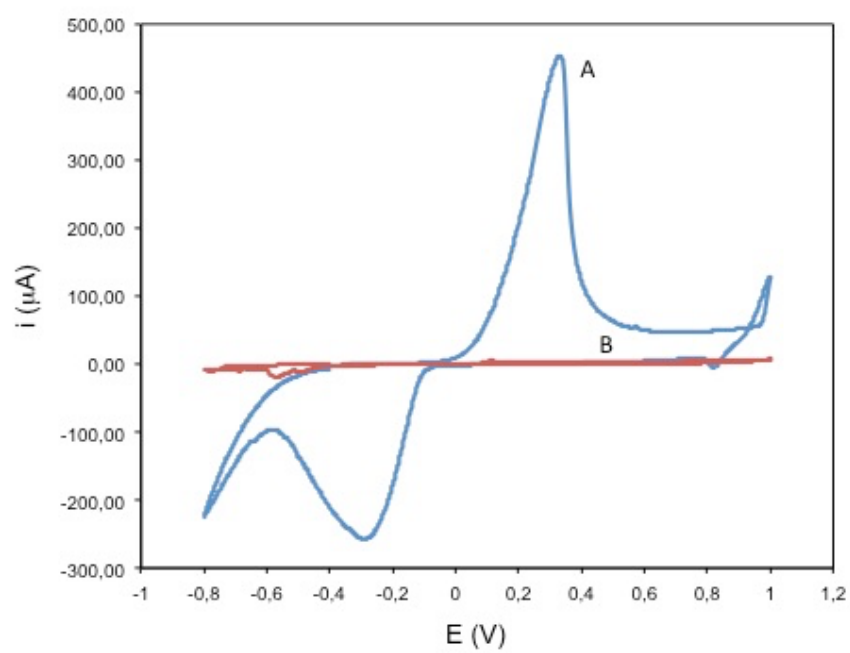


Fig. 4.

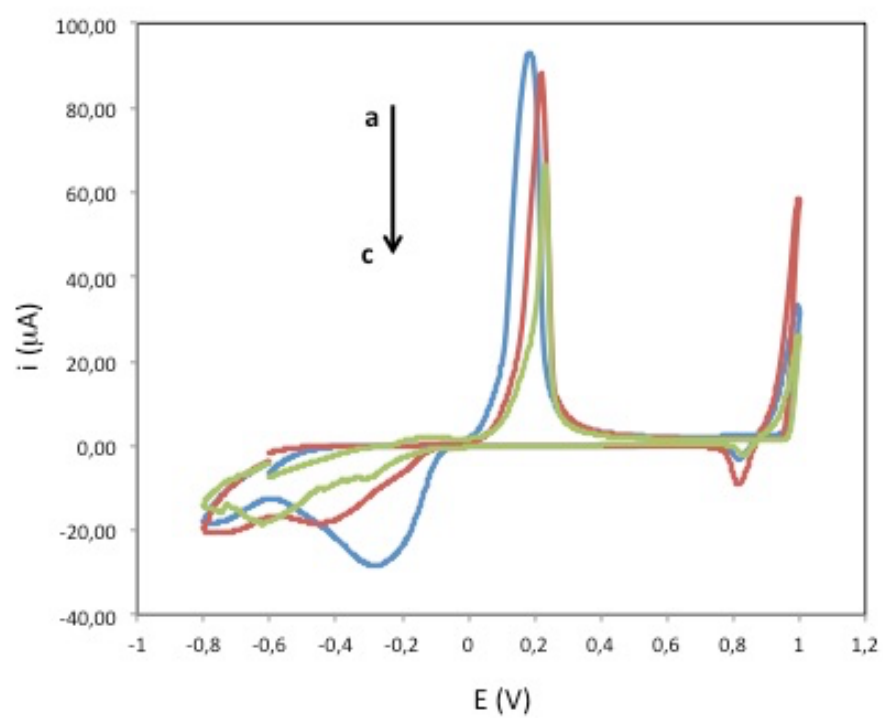


Fig. 5.

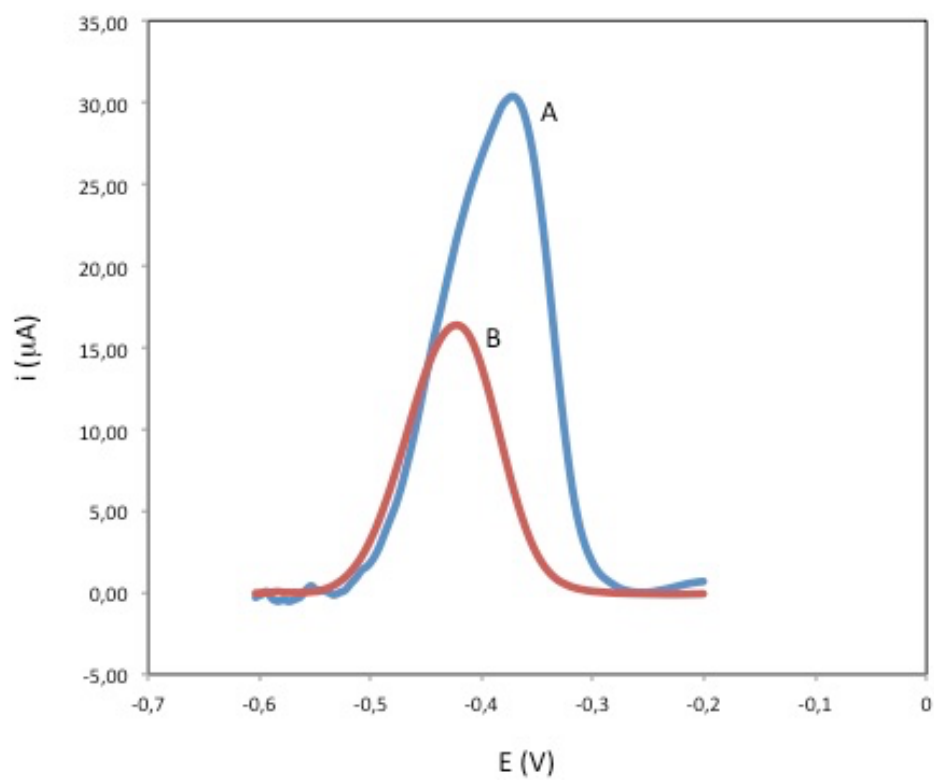


Fig. 6.

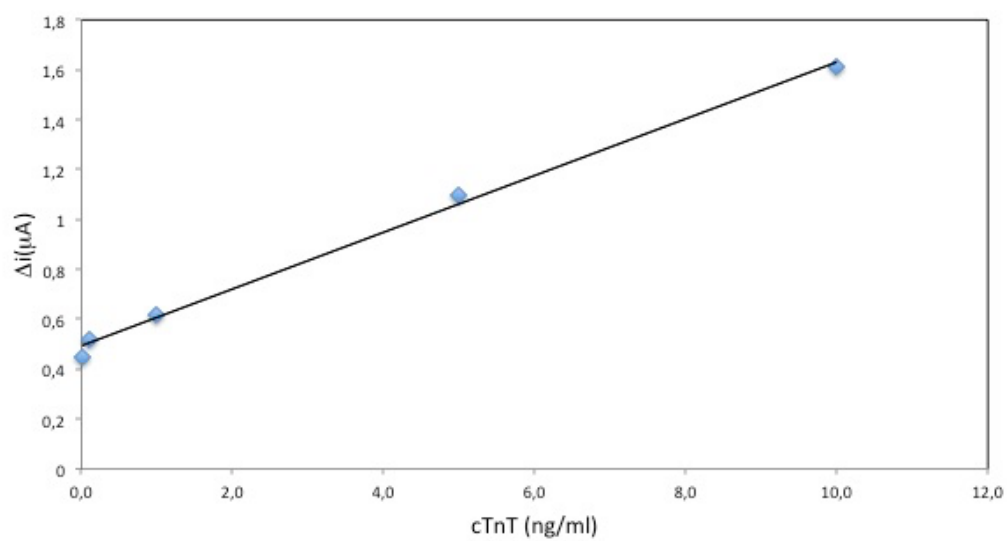


Fig. 7.

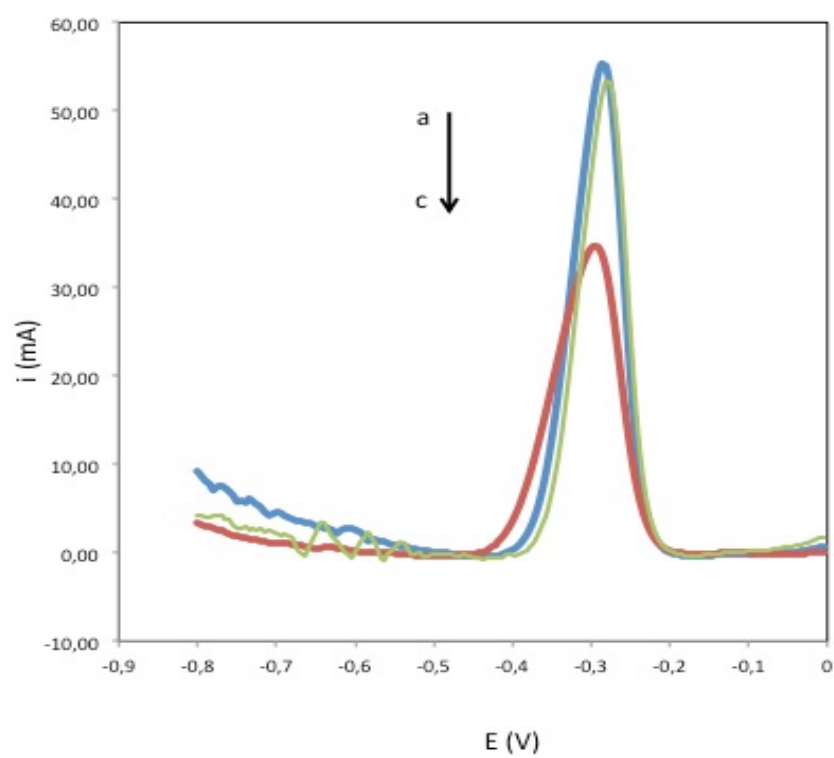


Fig. 8.

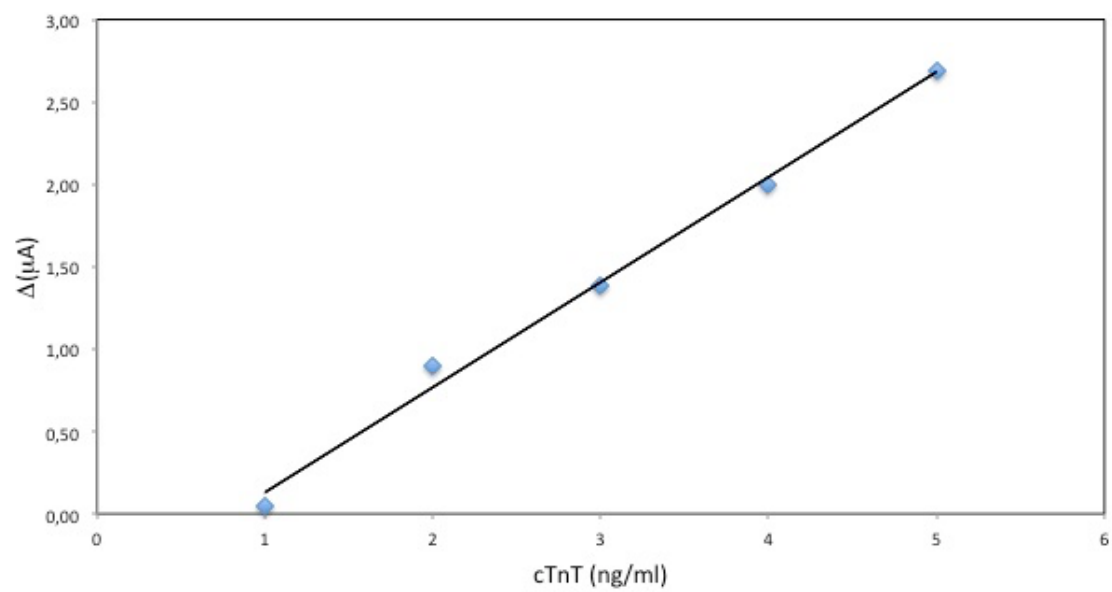


Fig. supplementary 1.

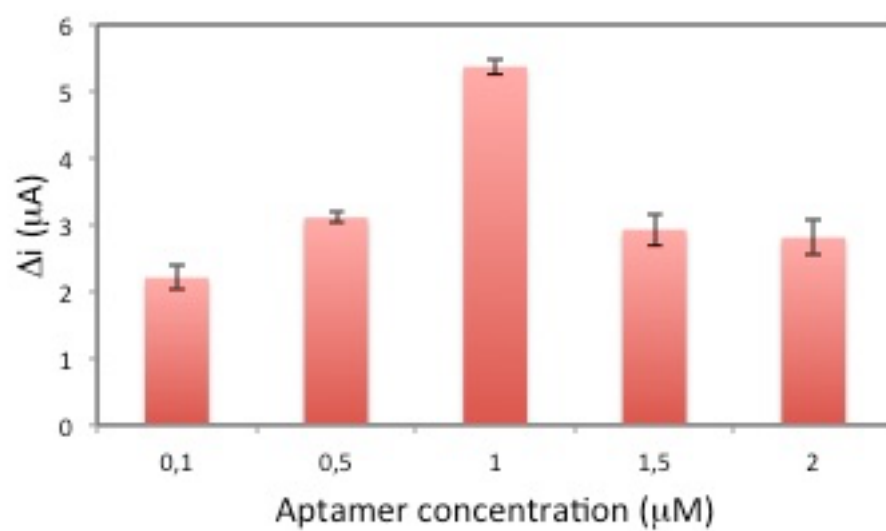
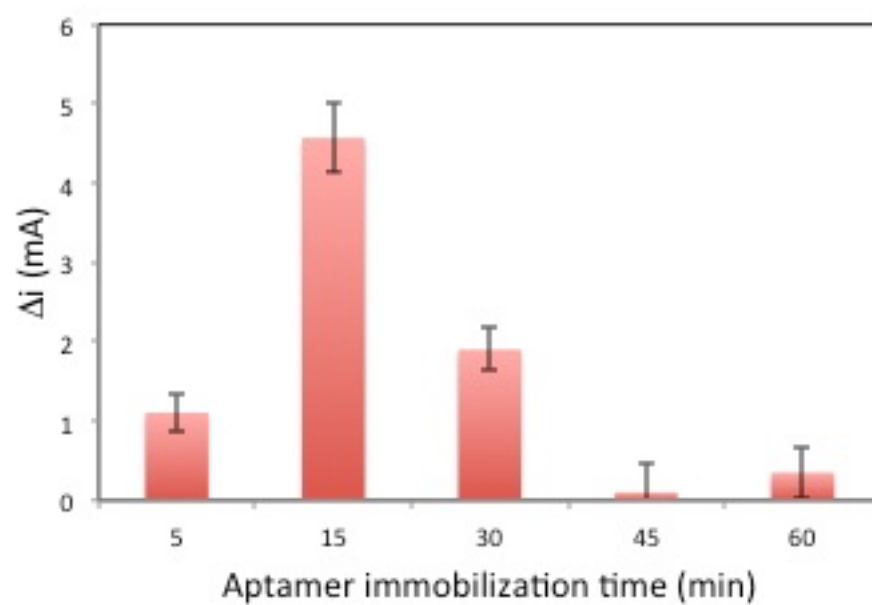


Fig. supplementary 2.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações Finais

A próxima etapa do nosso estudo será verificar se o aptasensor estudado é capaz de detectar troponina T cardíaca em amostras de sangue total, além de trabalharmos seu limite de detecção, visando valores mais baixos, próximos aos métodos considerados padrão ouro.

ANEXO

ARTIGO I – Biosensor based in Polyaniline Nanofibers, Silver Nanoparticles and Graphene Oxide for Human Papillomavirus detection in Real Samples

Enviado a revista: Analytica Chimica Acta

Fator de impacto: 4.517

Biosensor based in Polyaniline Nanofibers, Silver Nanoparticles and Graphene Oxide for Human Papillomavirus detection in Real Samples

Deborah M. L. Zanforlin^{1*}, Maria. A. Souto-Maior¹, Sérgio L. R. Gomes Filho¹, Blanca A. G. Rodriguez³, Mirella Monteiro S.¹, Natália C. L. Oliveira¹, Keilla M. Paz e Silva¹, Danielly S. Campos-Ferreira¹, Gustavo A. Nascimento¹, Danyelly Brunaska^{1, 2}, José A. O. Aguiar³, José L. Lima-Filho^{1,2}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8000

e-mail addresses: deborahzanforlin@gmail.com;

deborahzanforlin@hotmail.com (D.M Landim Zanforlin)

Abstract

An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor for Human Papillomavirus (HPV) type 34 and 73 specific detection was developed and tested with real samples. For the proposed biosensor, it was synthesized a conductor nanocomposite with nanofibers of polyaniline self-doped with sulfonic acid, silver nanoparticles and graphene oxide. The optimum conditions for immobilization of HPV probe and target recognition were investigated. The specificity was tested with the complementary (range from 1.0×10^{-12} up 1.0×10^{-16} M) and non-complementary targets applying differential pulse voltammetry method (DPV) and cyclic voltammetry method (CV). The hybridization detection presented a high sensitivity with a detection limit of 5.967×10^{-17} M. The performance of this biosensor was also evaluated with DNA extracted from samples. The results confirm the specificity and sensitivity of the biosensor to 34 and 73 types and it can be used like portable biosensors to assist in early detection of HPV infection.

Keywords: Electrochemical biosensor; Human Papillomavirus; Graphene Oxide; Nanofibers of Polyaniline; Silver Nanoparticles

ARTIGO II– The Using of electrochemical genosensors for detection of prostate cancer

Enviado a revista: Analytica Chimica Acta

Fator de impacto: 4.517

The Using of electrochemical genosensors for detection of prostate cancer

Arruda, M.S.^{1*} Zanforlin, D.M.L.,¹ Souto-Maior, M.A.,¹ Nascimento, G.A.¹, Campos-Ferreira, D..¹, Gomes-Filho, S.L.R.¹, Silva, M.M.¹; Ribeiro, W.S.B.¹; Oliveira, N.C.L.¹, Cabrera, M.¹, Carvalho Jr, L.B.^{1,2}, Lima-Filho, J.L.^{1,2}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA/ UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Biochemistry Department of Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235., CEP 506070-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

***Correspondence and reprints:** E-mail: mariana.s.arruda@gmail.com

Telephone: +55 8199549724 and +558130313710

Abstract

The marker currently used for prostate cancer (CaP) detection is prostate-specific antigen (PSA). However, the PSA test that may give false positive or negative information, is not reliable and does not allow the differentiation of benign prostate hyperplasia (BPH), non-aggressive and aggressive CaP. Thus,

there is an urgent to improve the early detection and accuracy of CaP diagnosis. In this way, the aim of this work was to development a new biosensor platform for the differential diagnosis of CaP. For this purpose, polypyrrole was first electrodeposited on the gold electrode surface to form film. Subsequently, 0.5 μ M CaP-specific probe was immobilized on the electrode surface with Polypirrol film. The measurement of biosensor was based on the reduction signals of methylene blue (MB) before and after hybridization between probe and DNA extracted from clinical samples. The results showed that in the presence of positive sample of CaP, the electrochemical signal decreased compared to the CaP probe immobilized on modified-electrode (from 0.96 μ A to 0.23 μ A), which confirmed the occurrence of hybridization in the proposed detection system. The specificity of the biosensor was studied by the incubation of the non-complementary sample and mix-sample (CaP probe and other). On the other hand, the interaction between the mix-sample and probe modified-electrode lead to a significant decrease in the current peak (from 0.96 μ A to 0.27 μ A), indicating that there is hybridization when the CaP is present in the sample. These results enable the development of the new portable detection system for CaP, helping in making an affective diagnosis in the early stages of cancer.

Keywords: Electrochemical DNA biosensor; Prostate Cancer; Screen-printed electrode; polypyrrole

Duas Patente:

1. Plataforma transdutora modificada com nanocompósito condutor para detecção de biomoléculas

		INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes	
	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho
 - 1.2 Qualificação: Médico
 - 1.3 CNPJ/CPF: 21638241449
 - 1.4 Endereço Completo: Av. Prof. Moraes do Rego, 1235 -Cidade Universitária, Recife
 - 1.5 CEP: 50670-901
 - 1.6 Telefone: (81) 21012508
 - 1.7 Fax: (81) 21268000
 - 1.8 E-mail: joseluiz60@gmail.com

☐ continua em folha anexa
2. **Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição
3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
PLATAFORMA TRANSDUTORA MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO CONDUTOR PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

5. Blanca Azucena Gómez Rodríguez
Qualificação: Física CPF: 01821526422
Endereço completo: Av. prof. Moraes do Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife
CEP: 50670-901
Telefone: (81) 21012508 Fax: (81) 2126 8000
Email: bagrdz@hotmail.com
6. Sérgio Luiz da Rocha Gomes Filho
Qualificação: Biólogo CPF: 04871058425
Endereço completo: Av. prof. Moraes do Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife
CEP: 50670-901
Telefone: (81) 21012508 Fax: (81) 2126 8000
Email: rochagomesfilho@gmail.com
7. Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba
Qualificação: Estudante CPF: 08961520490
Endereço completo: Av. prof. Moraes do Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife
CEP: 50670-901
Telefone: (81) 21012508 Fax: (81) 2126 8000
Email: mariameliaborba@gmail.com

2. Plataforma transdutora funcionalizado com ácido aminobenzenosulfônico

 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes			
DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA Código: FQ001	Página: 1/3 Versão: 2
Depósito de Pedido de Patente		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho
 1.2 Qualificação: Médico
 1.3 CNPJ/CPF: 216382414-49
 1.4 Endereço Completo: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235
 1.5 CEP: 50670-901
 1.6 Telefone: (81) 2126-8080 1.7 Fax:
 1.8 E-mail: joseluiz60@mac.com

☐ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PLATAFORMA TRANSDUTORA COMPOSTA DE 3,4-ETILENODIOXITIOFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO AMINOBENZENOSULFÔNICO

6.1 Renato Pessoa e Melo Neto

6.2 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: 015.094.064-50

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 8831-6185

6.7 Email: renatopessoaneto@gmail.com

6.1 Sérgio Luiz Rocha Gomes Filho

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3 CPF: 048.710.584-25

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 9163-1636

6.7 Email: rochagomesfilho@gmail.com

- 3 artigos publicados em parceria:

1. A carbono nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T



A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T

S.L.R. Gomes-Filho, A.C.M.S. Dias, M.M.S. Silva, B.V.M. Silva, R.F. Dutra

[Show more](#)

Choose an option to locate/access this article:

Check if you have access through your login credentials or your institution

[Check access](#)

[Purchase \\$41.95](#)

[Rent at DeepDyve](#)

[Get Full Text Elsewhere](#)

doi:10.1016/j.microc.2012.05.033

[Get rights and content](#)

2. A sensor tip based on carbono nanotube-ink printed electrode for the dengue vírus NS1 protein



A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein

Ana Carolina M.S. Dias, Sérgio L.R. Gomes-Filho, Mízia M.S. Silva, Rosa F. Dutra

[Show more](#)

Choose an option to locate/access this article:

Check if you have access through your login credentials or your institution

[Check access](#)

[Purchase \\$39.95](#)

[Rent at DeepDyve](#)

[Get Full Text Elsewhere](#)

doi:10.1016/j.bios.2012.12.033

[Get rights and content](#)

3. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode

Research Article



Received: 29 September 2013

Revised: 15 December 2013

Accepted article published: 6 January 2014

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.4305

Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode

Mízia M. S. Silva,^a Ana C. M. S. Dias,^a Bárbara V. M. Silva,^a
Sérgio L. R. Gomes-Filho,^a Lauro T. Kubota,^{b,c} Marília O. F. Goulart^{c,d}
and Rosa F. Dutra^{a*}