



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IMUNOENSAIOS**  
**APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DO INFARTO**  
**AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**BÁRBARA VIRGÍNIA MENDONÇA DA SILVA**

**Recife**

**2016**

**BÁRBARA VIRGÍNIA MENDONÇA DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IMUNOENSAIOS  
APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DO INFARTO  
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Amalia Fireman Dutra**

**Recife**

**2016**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Bárbara Virgínia Mendonça da

Desenvolvimento de sensores para imunoensaios aplicados ao diagnóstico do infarto agudo do miocárdio / Bárbara Virgínia Mendonça da Silva. – Recife: O Autor, 2016.

106 f.: il.

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 2016.

Inclui referências

1. Infarto do miocárdio 2. Coração – Doenças – Diagnóstico I. Dutra, Rosa Amália Fireman (orientadora) II. Título.

616.1237

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-128

**BÁRBARA VIRGÍNIA MENDONÇA DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IMUNOENSAIOS  
APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DO INFARTO  
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**APROVADA EM 24/02/2016.**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Amalia Fireman Dutra**

(Dept. de Engenharia Biomédica – UFPE) – Orientadora.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Tereza dos Santos Correia**

(Dept. de Bioquímica – UFPE) – 1<sup>a</sup> Examinadora.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beate Saegesser Santos**

(Dept. de Ciências Farmacêuticas – UFPE) – 2<sup>a</sup> Examinadora.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Fontes**

(Dept. de Biofísica e Radiobiologia– UFPE) – 3<sup>a</sup> Examinadora.

---

**Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo**

(Dept. de Engenharia Eletrônica e Sistemas – UFPE) – 4<sup>a</sup> Examinador.

---

**Dr.<sup>a</sup> Alessandra Batista de Mattos**

(Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE) – 5<sup>a</sup> Examinadora.

**Recife**

**2016**

*Aos meus pais Fernando e Fernanda e irmão Vinícius  
por todo amor, carinho e dedicação...  
Ao meu marido Thiago Albert pelo amor, companheirismo e incentivo...  
E ao meu pequeno Heitor, que renova as esperanças do futuro...  
... dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me guiado e iluminado meu caminho para que eu alcançasse mais um objetivo em minha vida e pela força para superar os obstáculos encontrados nesta caminhada.

À Prof<sup>a</sup>. Rosa Fireman Dutra, pela oportunidade concedida, confiança, orientação e dedicação dispensada desde o início da minha carreira científica.

À Prof<sup>a</sup>. Pilar, pelos valiosos conselhos, sugestões e ensinamentos.

À minha família (Thiago, Fernando, Fernanda e Vinícius) e à minha tia Dulce por acreditar nesse sonho e me apoiar em cada desafio.

Aos amigos Alessandra Mattos, Ana Carolina, Igor Teixeira, Joilson Ramos, Lays Rocha, Mízia Sabóia, Sérgio Rocha, Paulo Landim e Tatianny Freitas pelas experiências científicas e pessoais divididas ao longo dessa caminhada. Amizades que estarão marcadas para sempre.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico (LAPED), em especial a Amanda, Blanca, Auvani, Priscila, Gilvânia e Cybelle, com os quais foram divididos momentos de descontração e apoio.

À coordenação, professores e funcionários do RENORBIO, que contribuíram para a formação do meu caráter e conduta científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela cooperação na realização de serviços técnicos de microscopia eletrônica e espectroscopia por infravermelho.

*“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo, é renovar as esperanças na vida e o mais importante acreditar em você de novo...”.*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

*“Cada segundo é tempo de mudar tudo para sempre”.*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

A presente tese descreve o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para imunoensaios empregando a tecnologia de eletrodos impressos com a finalidade de detectar a troponina T cardíaca, o marcador mais específico, atualmente, do infarto agudo do miocárdio. Um dos desafios na confecção de sensores eletroquímicos para imunoensaios é alcançar baixos limites de detecção. Nanomateriais de carbono são, recentemente, considerados excelentes estratégias no preparo de superfícies sensoras devido às suas excelentes propriedades, tais como rápida transferência elétrica e atividade catalítica, aumento da relação superfície/volume e, consequentemente, maior quantidade de biomoléculas imobilizadas. Nesta tese, nanotubos de carbono e grafeno foram utilizados sob diferentes abordagens para modificação de superfícies eletródicas. Um imunossensor baseado em eletrodos serigrafados obtidos pela impressão de filmes de nanotubos de carbono amino funcionalizados incorporados em tinta de carbono foi desenvolvido para detecção “livre de marcação”. Os grupos amino dos nanotubos expostos na interface sensora impressa foram utilizados para imobilização orientada dos anticorpos monoclonais anti-troponina T. Os nanofilmes impressos apresentaram uma excelente estabilidade e reprodutibilidade, exibindo um desvio padrão relativo (DP) menor que ~2% (n = 8), comparado com controle (DP ~9%, n = 8). A resposta analítica do sensor, obtida por voltametria de pulso diferencial, apresentou uma faixa linear entre 0,0025 e 0,5 ng/mL de troponina T ( $r = 0,995$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 7$ ), combinado a um baixo erro relativo ( $< 1\%$ ) e limite de detecção de 0,0035 ng/mL. Com o propósito de substituir os anticorpos anti-troponina T, visto que estes constituem parte onerosa do dispositivo, um sensor biomimético foi desenvolvido a partir de uma superfície nanoestruturada de grafeno e polipirrol. A técnica de impressão biomimética em superfície (“*surface imprinting*”) foi utilizada como estratégia para simplificar e reduzir em uma única etapa a produção das cavidades biomiméticas. Estas foram obtidas através da eletropolimerização do polipirrol e derivados copolímeros orgânicos mimetizando grupos proteicos amino-reativos. As respostas analíticas do sensor foram geradas por voltametria de pulso diferencial, exibindo uma faixa linear de resposta variando de 0,01 a 0,1 ng/mL de troponina T ( $r = 0,9953$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 5$ ) e um limite de detecção de 0,006 ng/mL, mostrando um ótimo desempenho do sensor biomimético. As cavidades biomiméticas apresentaram uma constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $7,3 \cdot 10^{-13}$  mol/L, indicando boa afinidade à troponina quando comparadas com o sensor controle (sem troponina T),  $K_D$  igual a  $11,6 \cdot 10^{-13}$  mol/L. Em conclusão, ambas as plataformas sensoras mostram potencial para detecção da troponina T em níveis de importância clínica no diagnóstico do infarto agudo, constituindo testes de pronto atendimento para emergências cardiológicas.

**Palavras-chave:** imunossensor; sensor biomimético; eletrodo impresso; nanotubo de carbono; grafeno; troponina T cardíaca.

## ABSTRACT

This thesis describes the development of electrochemical sensors for immunoassay by using a screen-printed electrodes technology in order to detect the human cardiac troponin T, the most important marker currently of the acute myocardial infarction. One of the challenges in the manufacturing of electrochemical sensors for immunoassays is to reach low limits of detection. Carbon nanomaterials are recently considered excellent strategies in preparing sensing surfaces due to their excellent properties, such as rapid electrical transfer and catalytic activity, increase surface / volume ratio and, consequently, offering higher amount of immobilized biomolecules. In this thesis, carbon nanotubes and graphene were used under different approaches in order to modify the sensors surfaces. An immunosensor based on screen printed electrode obtained by printing of amino functionalized carbon nanotubes films incorporated into carbon ink has been developed for "label-free" detection. The amino groups exposed on the imprinted sensor interface were utilized for oriented immobilization of the monoclonal antibody anti-troponin T. The imprinted nanofilms showed an excellent stability and reproducibility, exhibiting a relative standard deviation (RSD) less than ~2% (n = 8) compared to control (RSD ~9%, n = 8). The analytical response of the sensor, obtained by differential pulse voltammetry, showed a linear range between 0.0025 and 0.5 ng/mL ( $r = 0.995$ ;  $p < 0.0001$ , n = 7), combined with a low relative error ( $< 1\%$ ) and a calculated limit of detection of 0.0035 ng/mL. In order to replace the anti-troponin T antibody, since these are costly part of the device, a biomimetic sensor was developed from a nanostructured surface of graphene and polypyrrole. The biomimetic technique of surface imprinting was used as a strategy for simplify and reduce in a one-step production of the biomimetic cavities. These were obtained by electropolymerization of the pyrrole and its organic copolymers mimicking amino reactive protein groups. The analytical responses of the sensor were obtained by differential pulse voltammetry, exhibiting a linear range response in 0.01 and 0.1 ng/mL of troponin T ( $r = 0.9953$ ;  $p < 0.0001$ , n = 5) and a limit of detection of 0.006 ng/mL, showing a good performance of the biomimetic sensor. The biomimetic sites exhibited a dissociation constant ( $K_D$ ) of  $7.3 \cdot 10^{-13}$  mol/L, indicating a good affinity to troponin when compared to its control (without troponin T),  $K_D$  equal to  $11.6 \cdot 10^{-13}$  mol/L. In conclusion, both sensor platform the sensor platforms showed a potential for troponin T detection in levels of clinical important for acute myocardial infarction diagnostic, constituting point-of-care testing for cardiac emergency departments.

**Keywords:** immunosensor; biomimetic sensor; screen-printed electrode; carbon nanotube; graphene; cardiac troponin T.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Distribuição global das mortes causadas por CVDs no ano de 2011 de acordo com a WHO.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática da secção longitudinal da ruptura de uma placa aterosclerótica no subendotélio da artéria coronariana em um coração infartado.....                                                                                                                                                                                                                                           | 20 |
| <b>Figura 3.</b> Troponinas cardíacas C, T e I no aparato contrátil miofibrilar e sua distribuição nos cardiomiócitos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos componentes de um biossensor.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Modelo esquemático da estrutura molecular do anticorpo da classe IgG, demonstrando a presença das cadeias leves e pesadas, subdivididas em porção Fc e Fab, e os sítios de reconhecimento antigênico.....                                                                                                                                                                                              | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a superfície sensora.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Reação de ativação dos grupos carboxílicos do anticorpo via EDC/NHS para imobilização orientada sobre uma superfície sensora.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 32 |
| <b>Figura 8.</b> Representação das principais etapas do processo de síntese dos MIPs.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 34 |
| <b>Figura 9.</b> Síntese eletroquímica do PPy.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 37 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema do processo de confecção de um SPE.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Figura 11.</b> (a) Representação esquemática dos vetores na rede em uma folha de GR para produção dos diferentes tipos de CNTs (“armchair”, “zig-zag” e “chiral”) e (b) estrutura dos MWCNTs.....                                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| <b>Figura 12.</b> Representação gráfica da técnica de CV: (a) variação linear do potencial vs. tempo e (b) voltamograma cíclico indicando os principais parâmetros a serem analisados: $I_{pa}$ , $I_{pc}$ , $E_{pa}$ e $E_{pc}$ .....                                                                                                                                                                                  | 45 |
| <b>Figura 13.</b> (a) Principais componentes do circuito equivalente de Randles, onde RCT corresponde à resistência à transferência de carga Cdl, à capacitância da dupla camada elétrica, $R_s$ , à resistência da solução, e W, à impedância de Warburg; e (b) diagrama de Nyquist, indicando as componentes real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) da impedância em função da variação da frequência ( $\omega$ )..... | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Esquema do princípio de um espectrômetro de FTIR na geração de um espectro.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 49 |

**Figura 15.** (a) Esquema ilustrativo de um sistema eletroquímico de detecção livre de marcação empregando a técnica de DPV e (b) gráfico representativo dos sinais de excitação em pulsos de potencial vs. tempo para obtenção dos voltamogramas de pulso diferencial.....52

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC – Corrente alternada

AFM – Microscopia de força atômica, do inglês “*Atomic Force Microscopy*”

AMI – Infarto agudo do miocárdio, do inglês “*Acute Myocardial Infaction*”

AST – Aspartato aminotransferase, do inglês “*Aspartate Aminotransferase*”

ATR – Reflectância total atenuada, do inglês “*Attenuated Total Reflectance*”

C<sub>dl</sub> – Capacitância da dupla camada eletrodo/solução

CK – Creatina quinase, do inglês “*Creatine Kinase*”

CK-MB – Isoenzima MB da Creatina quinase, do inglês “*Creatine Kinase Muscle-Brain*”

CNTs – Nanotubos de carbono, do inglês “*Carbon Nanotubes*”

CVDs – Doenças cardiovasculares, do inglês “*Cardiovascular Diseases*”

cTnI – Troponina I cardíaca

cTnT – Troponina T cardíaca

CV – Voltametria cíclica, do inglês “*Cyclic Voltammetry*”

DPV – Voltametria de pulso diferencial, do inglês “*Differential Pulse Voltammetry*”

ECG – Eletrocardiograma

ECLIA – Imunoensaios por eletroquimioluminescência, do inglês “*Electrochemiluminescence Immunossay*”

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, do inglês “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”

EDC – *N*-etil-*N*-(dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA – Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”

E<sub>pa</sub> – Potenciais de pico anódico

E<sub>pc</sub> – Potenciais de pico catódico

F<sub>ab</sub> – Fragmentos ligadores de antígenos, do inglês “*Fragment antigen binding*”

F<sub>c</sub> – Fração constante, do inglês “*Fragment constant*”

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”

GR – Grafeno, do inglês “*Graphene*”

Ig – Imunoglobulina

$I_{pa}$  – Corrente de pico anódico

$I_{pc}$  – Corrente de pico catódico

LDH – Lactato desidrogenase, do inglês “*Lactate Dehydrogenase*”

MIP – Polímero Molecularmente Impresso, do inglês “*Molecularly Imprinted Polymer*”

MWCNTs – Nanotubo de carbono de múltiplas paredes, do inglês “*Multi-Walled Carbon Nanotubes*”

NHS – *N*-hidroxi-succinamida

nm – Nanômetros

PPy – Polipirrol, do inglês “*Polypyrrole*”

Py – Pirrol, do inglês “*Pyrrole*”

QCM – Microbalança de cristal de quartzo, do inglês “*Quartz Crystal Microbalance*”

$R_{ct}$  - Resistência de transferência de carga

$R_s$  – Resistência da solução

SAMs – Monocamadas auto-organizadas, do inglês “*Self-assembled monolayers*”

SEM – Microscopia eletrônica de varredura, do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”

SPE – Eletrodos impressos, do inglês “*Screen-Printed Electrode*”

SPR – Ressonância de plásmon de superfície, do inglês “*Surface Plasmon Resonance*”

SWCNTs – Nanotubo de carbono de parede simples, do inglês “*Single-Walled Carbon Nanotubes*”

W – Impedância de Warburg

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

$Z'$  – Componente real

$Z''$  – Componente imaginária

$\omega$  - Frequência

$\mu\text{m}$  – Micrômetros

# SUMÁRIO

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>                                               | <b>15</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                   | <b>18</b> |
| 2.1 Doenças cardiovasculares.....                                      | 18        |
| 2.1.1 Infarto agudo do miocárdio.....                                  | 19        |
| 2.1.2 Diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.....                   | 20        |
| 2.1.3 Marcadores cardíacos.....                                        | 21        |
| 2.1.4 Troponinas cardíacas.....                                        | 23        |
| 2.1.5 Métodos de detecção da cTnT usados na rotina clínica.....        | 25        |
| 2.1.5.1 Imunoensaios.....                                              | 25        |
| 2.2 Biossensores.....                                                  | 26        |
| 2.2.1 Imunossensores.....                                              | 29        |
| 2.2.1.1 Imobilização de anticorpos.....                                | 31        |
| 2.2.2 Sensores biomiméticos.....                                       | 33        |
| 2.2.2.1 Métodos de obtenção de MIPs de proteínas em sensores.....      | 35        |
| 2.2.2.2 Sensores biomiméticos baseados em polímeros condutores.....    | 36        |
| 2.2.2.3 Técnicas de remoção da molécula molde.....                     | 38        |
| 2.3 Novas tendências em plataformas sensoras.....                      | 39        |
| 2.3.1 Eletrodos impressos.....                                         | 39        |
| 2.3.2 Nanomateriais de carbono.....                                    | 41        |
| 2.4 Caracterização de superfícies sensoras.....                        | 43        |
| 2.4.1 Técnicas eletroquímicas.....                                     | 43        |
| 2.4.1.1 Voltametria cíclica.....                                       | 44        |
| 2.4.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica.....                | 46        |
| 2.5 Caracterização estrutural e topográfica.....                       | 47        |
| 2.5.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier..... | 48        |
| 2.5.2 Microscopia eletrônica de força atômica.....                     | 50        |
| 2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura.....                         | 51        |
| 2.6 Bioensaios eletroquímicos livres de marcador.....                  | 51        |
| 2.7 Imunossensores e sensores biomiméticos para detecção da cTnT.....  | 52        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                               | <b>56</b> |
| 3.1 Objetivo geral.....                                                | 56        |

|                                                 |            |
|-------------------------------------------------|------------|
| 3.2 Objetivos específicos.....                  | 56         |
| <b>4. MANUSCRITOS.....</b>                      | <b>57</b>  |
| 4.1 Manuscrito I.....                           | 57         |
| 4.2 Manuscrito II.....                          | 70         |
| <b>5.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>              | <b>83</b>  |
| <b>6.REFERÊNCIAS.....</b>                       | <b>85</b>  |
| <b>7. APÊNDICE.....</b>                         | <b>104</b> |
| 7.1 Apêndice A - Curriculum vitae do autor..... | 104        |

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as diversas manifestações clínicas que compreendem as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio tem se destacado como principal causa de hospitalização e atendimento em emergências cardiológicas. Para o diagnóstico diferencial do AMI, é consenso do Colégio Americano de Cardiologia (THYGESEN et al., 2012) e da Sociedade Brasileira de Cardiologia (NICOLAU et al., 2014) a realização do teste de dosagem sérica das troponinas cardíacas T e I.

Imunoensaios baseados na medição indireta da reação antígeno-anticorpo através de compostos cromógenos e quimioluminescentes têm sido empregados para dosagens das troponinas cardíacas. Embora bem estabelecidos na rotina diagnóstica, os imunoensaios são demorados e exigem processamento em uma unidade laboratorial. Uma vez que recomenda-se o tempo mínimo de 60 minutos decorridos desde a coleta, processamento e análise para liberação do resultado das troponinas em emergências cardiológicas. Este tempo, considerado crítico, está diretamente relacionado ao sucesso e direcionamento da conduta terapêutica (NICOLAU et al., 2014). Visando superar o retardo no diagnóstico, uma alternativa é a disponibilização de tecnologias à beira do leito ou testes de pronto atendimento ("*point-of-care testing*").

Recentemente, testes imunocromatográficos de tira em fluxo lateral para troponina T vêm sendo realizados como testes de pronto atendimento em algumas emergências. Apesar de serem práticos e rápidos, os testes de tira, por outro lado, apresentam uma baixa sensibilidade diagnóstica e se limitam a ofertar resultados apenas qualitativos (sim ou não como resposta) ou semi-quantitativos, limitando-se a detecção de uma faixa de concentração, o que dificulta correlacionar à extensão da lesão do músculo cardíaco, vindo a corroborar com uma análise de custo-efetividade desfavorável. Diante do exposto, a opção por testes à beira do leito quantitativos, com sensibilidade e especificidade diagnóstica desejável tem levado ao interesse por pesquisas na área de imunossensores na última década. Os imunossensores são dispositivos eletrônicos que convertem em um sinal elétrico, o reconhecimento seletivo e específico da interação antígeno-anticorpo. Nos imunossensores, diferentes sistemas de transdução podem ser empregados na conversão da resposta elétrico-bioquímica, destacando os transdutores ópticos, piezelétricos e eletroquímicos.

Os primeiros imunossensores relatados para detecção da troponina T cardíaca humana foram desenvolvidos por transdução óptica, através do princípio de ressonância de plasmon de

superfície (DUTRA & KUBOTA, 2007; DUTRA et al., 2007) e por transdução piezelétrica com uso da microbalança de cristal de quartzo (WONG-Ek et al., 2010; MATTOS et al., 2012). Em ambos os tipos de transdutores, a detecção da troponina T foi baseada na resposta direta à interação antígeno-anticorpo, ou seja, em tempo real, com sistema em batelada. Embora se apresentem vantajosos quando comparados aos imunoenaios tradicionais, devido à rapidez de análise, os sistemas de transdução não se mostram facilmente convertidos a uma tecnologia portátil e de baixo custo, uma vez que os eletrodos de ouro e quartzo utilizados, respectivamente, nas medidas ópticas e piezelétricas, são relativamente onerosos para uma tecnologia à beira do leito em que o ensaio deve ser de mono uso.

Uma das perspectivas de transdutores eletroquímicos para imunoenaios de mono uso pode ser alcançada através da tecnologia de eletrodos impressos. Estes dispositivos oferecem diversas vantagens, tais como facilidade de miniaturização, menor custo e compatibilidade com as tecnologias de produção em larga escala de sensores. O princípio de confecção dos eletrodos impressos é baseado na impressão de tintas condutoras sobre um suporte inerte cerâmico ou plástico (FANJUL-BOLADO et al., 2008; TALEAT, KHOSHROO & MAZLOUM-ARDAKANI, 2014). A facilidade em imprimir eletrodos com áreas e espessuras diferentes, aliada à simplicidade para incorporação de elementos modificadores, que promovam o aumento na condutividade, área superficial e transferência de elétrons, tem destacado esta tecnologia como uma das mais vantajosas para elaboração de testes de triagem e à beira do leito. Aliado a isso, a incorporação de nanomateriais de carbono, tais como nanotubos de carbono e grafeno tem guiado o desenvolvimento de novas estratégias para confecção de eletrodos com características eletroanalíticas mais aprimoradas, tais como alta área superficial, excelente condutividade elétrica e versatilidade para funcionalização com diferentes grupos proteína-reativo.

O monitoramento da interação antígeno-anticorpo nos transdutores eletroquímicos, em geral, utiliza espécies eletroativas como marcadores indiretos da detecção do analito. Embora seletivos, a utilização de espécies eletroativas apresenta limitações quando à sensibilidade para detecção de baixas concentrações do analito e maior tempo de resposta, uma vez que etapas adicionais são necessárias para detecção da reação enzimática. Assim, há recentemente um crescente interesse no desenvolvimento de dispositivos à beira do leito mais simples e rápidos através do monitoramento direto da interação antígeno-anticorpo empregando sistemas livres de marcação em transdutores eletroquímicos (GOPINATH et al., 2014). Dentre as técnicas, destacam-se a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial.

A otimização da interação antígeno-anticorpo na interface sensora é uma das etapas críticas para obtenção de imunossensores mais sensíveis, estáveis e reprodutíveis eletroquimicamente. Embora tenha-se alcançado hoje um grande avanço no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos com perspectivas de obtenção de imunoensaios mono uso em larga escala, ainda é um entrave o custo das biomoléculas biorreceptoras, uma vez que para uma melhor especificidade é desejável a utilização de anticorpos monoclonais. No intuito de superar estas limitações, alternativamente aos sistemas convencionais de biorreconhecimento, tem-se optado por sistemas biomiméticos baseados em polímeros molecularmente impressos. Estes apresentam duas importantes vantagens que incluem a fácil obtenção, quando comparado à produção de anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes e aptâmeros, e resistência a ambientes adversos, nos quais biomoléculas poderiam ser desnaturadas (IRSHAD et al., 2013. DING & HEINDEN, 2014).

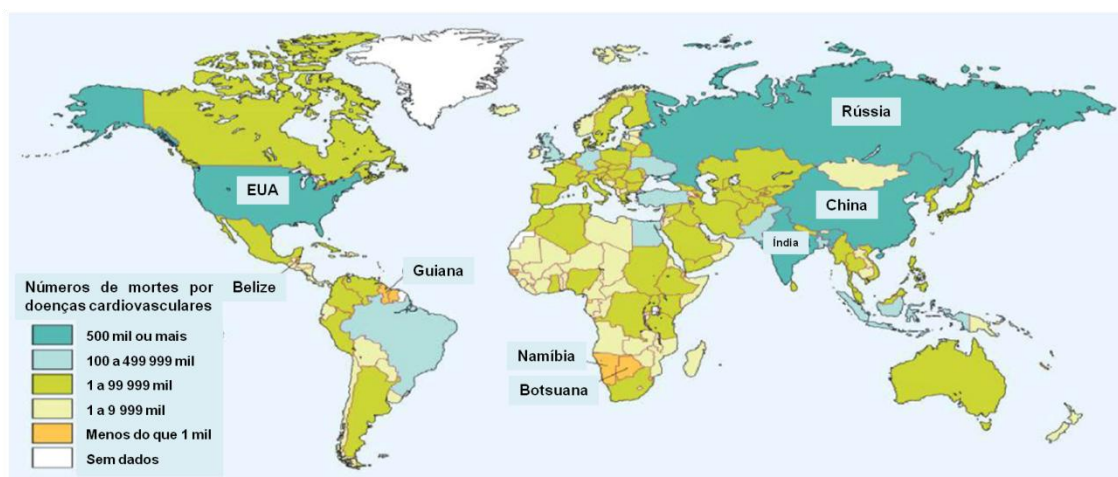
Diante do exposto, nesta tese, optou-se por desenvolver um imunossensor eletroquímico, baseado em anticorpos monoclonais de proteína recombinante, e um sensor biomimético, utilizando eletrodos impressos modificados com nanomateriais de carbono para detecção eletroquímica livre de marcador (*“label-free”*) da troponina T cardíaca humana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças cardiovasculares

Atualmente, as doenças cardiovasculares (CVDs, do inglês “*Cardiovascular Disease*”) são a causa mais comum de morbidade e a principal causa de mortalidade no mundo, representando um grande desafio à saúde pública. Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês “*World Health Organization*”) contabilizaram cerca de 17,5 milhões de mortes por CVDs em 2012. Destas mortes, 7,4 milhões foram relacionadas às doenças coronárias isquêmicas e 6,7 milhões devido a acidentes vasculares cerebrais (WHO, 2015<sub>a</sub>). Apesar do documentado declínio da mortalidade por CVDs nos países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento essa curva ainda é ascendente, acentuada e pelo menos 2,8 vezes maior (DIAS et al., 2013) (**Figura 1**). As estatísticas preveem que até 2020 as CVDs serão responsáveis por um terço (34%) dos óbitos em países em desenvolvimento e até 2030 serão registradas cerca de 23,3 milhões de mortes a nível mundial (WHO, 2015<sub>a</sub>). A elevada incidência das CVDs pode ser justificada pela incapacidade de um controle eficaz dos fatores de risco clássicos, como tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia e obesidade (FORD et al., 2007; RUFF & BRAUNWALD, 2011).

**Figura 1.** Distribuição global das mortes causadas por CVDs no ano de 2011 de acordo com a WHO.



FONTE: WHO, 2015<sub>b</sub>.

O impacto das doenças cardiovasculares é sentido não apenas no sistema de saúde, mas também na economia como um todo, uma vez que os pacientes tem seu rendimento produtivo afetado em plena fase laboral (30 a 69 anos) (JOUKAR et al., 2014). Anualmente,

cerca de 100 a 120 bilhões de dólares são gastos com internações e tratamentos de pacientes acometidos pelas CVDs no mundo (LIBBY, 2013). Dados divulgados pelo Banco Mundial mostram que 75% dos custos financeiros na saúde brasileira são gastos com o tratamento de doenças isquêmicas do coração, gerando maiores custos principalmente com internações hospitalares para o Sistema Único de Saúde (MANSUR & FAVARATO, 2012). No Brasil, em 2010, foram registrados 79.954 óbitos associados à síndrome coronariana aguda. Esses números totalizam os óbitos por angina e o AMI, correspondendo a 7,05% do total de óbitos no ano, ou 24,67% dos óbitos por doenças do aparelho circulatório (PIEGAS et al., 2013).

### 2.1.1 Infarto agudo do miocárdio

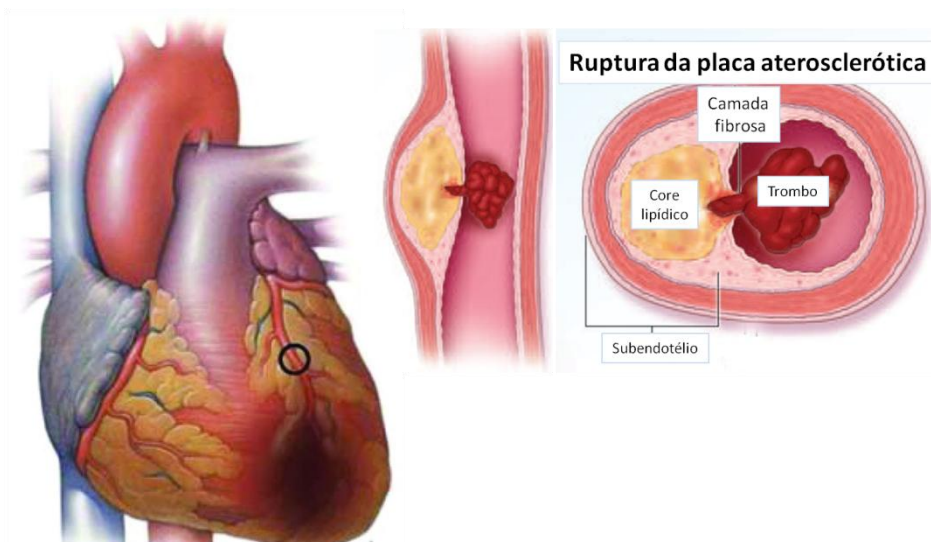
A síndrome coronariana aguda compreende um amplo espectro de manifestações clínicas de doenças isquêmicas cardíacas, que incluem a angina instável e o infarto agudo do miocárdio (AMI, do inglês “*Acute Myocardial Infarction*”) (KURZ, MATTU & BRADY, 2014). A angina instável manifesta-se devido à decorrência de isquemia moderada e transitória no miocárdio. Já o AMI caracteriza-se quando a isquemia se torna prolongada e irreversível resultando na necrose do miocárdio. O AMI tem se destacado como a principal causa de morte súbita e de atendimentos em emergências cardiológicas. A ruptura de placas ateroscleróticas associadas à formação de trombos intracoronarianos, que obstruem o fluxo sanguíneo no miocárdio, tem se destacado como uma das causas fisiopatológicas do AMI (CHAN & NG, 2010).

A aterosclerose, por sua vez, é uma doença inflamatória crônica do subendotélio arterial associada a diversos fatores de risco, como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão arterial e tabagismo. Na aterosclerose, disfunções na parede arterial aumentam a permeabilidade da íntima (parte interna das artérias) às lipoproteínas de baixa densidade plasmáticas, que se acumulam no espaço subendotelial, sendo oxidadas e tornando-se imunogênicas. O endotélio interpreta estas mudanças como sinal de agressão ao organismo e ativa o sistema de defesa do corpo, desencadeando uma resposta inflamatória. Desse modo, há um aumento na expressão de moléculas de adesão leucocitária no endotélio responsável pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial (MOTTA et al., 2013).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação de células musculares lisas no local da lesão, que passam a produzir a matriz extracelular que formará uma capa fibrosa, caracterizando a placa aterosclerótica. A placa aterosclerótica formada caracteriza-se assim por um core lipídico envolto por uma camada fibrosa. A ruptura da capa

fibrosa das placas, devido a tensões geradas pela pressão arterial, expõe um material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo intracoronariano (**Figura 2**) (MOTTA et al., 2013; LIBBY, 2013).

**Figura 2.** Representação esquemática da secção longitudinal da ruptura de uma placa aterosclerótica no subendotélio da artéria coronariana em um coração infartado.



Adaptado de: LIBBY, 2013 e THYGESEN et al., 2012.

### 2.1.2 Diagnóstico do infarto agudo do miocárdio

Sabe-se que a maioria das mortes por AMI ocorre nas primeiras horas de manifestação clínica da doença, sendo 40% a 65% na primeira hora do início dos sintomas e aproximadamente 80% nas primeiras 24 horas. Assim, a maioria das mortes por AMI acontece fora do hospital, sendo muitas vezes desassistidas por um atendimento especializado que pode ser crucial para reversão do quadro clínico, uma vez que o efeito da revascularização do miocárdio é estritamente dependente da detecção rápida e adequada (MAGEE et al., 2012; LIBBY, 2013; NICOLAU et al., 2014). Para diagnóstico do infarto, os pacientes devem apresentar pelo menos duas das três condições estabelecidas pela WHO: dor precordial característica, alterações no eletrocardiograma (ECG) e elevação dos marcadores cardíacos (THYGESEN et al., 2012<sub>a</sub>; THYGESEN et al., 2012<sub>b</sub>).

O sintoma clínico mais importante e típico do AMI é a dor precordial ou desconforto intenso retroesternal, que é muitas vezes referida como aperto, opressão, peso ou queimação. Frequentemente, esse sintoma é acompanhado por náuseas, vômitos, sudorese, palidez e sensação de morte iminente. Entretanto, a dor precordial é muitas vezes confundida com

sintoma gastrointestinal, muscular e respiratório, aumentando a demora por atendimento (PESARO, SERRANO JR. & NICOLAU, 2004).

Associado aos sintomas clínicos, a investigação eletrocardiográfica tem sido o principal método de diagnóstico do AMI nos últimos anos. O exame eletrocardiográfico deve ser realizado idealmente em menos de 10 minutos da apresentação à emergência e é o centro do processo decisório inicial de pacientes com suspeita de AMI. A técnica é baseada no somatório dos potenciais elétricos gerados pelas fibras miocárdicas à medida que o impulso elétrico percorre o coração durante o processo de despolarização e repolarização da membrana das células cardíacas. Assim, as flutuações dos potenciais neste processo podem ser mensuradas através da distribuição de eletrodos em pontos opostos do coração e registradas através de um amplificador (GUYTON & HALL, 2006).

As principais alterações do ECG em pacientes com infarto incidem sobre o período da repolarização das células cardíacas representado pelo segmento ST e onda T no ECG. O segmento ST representa o tempo entre o fim da despolarização e o início da repolarização dos ventrículos. A onda T caracteriza a repolarização dos ventrículos, que passam a ficar aptos para uma nova contração (GUYTON & HALL, 2006). A inversão da onda T no ECG de pacientes com AMI ocorre devido à modificação das propriedades físico-químicas da membrana celular dos cardiomiócitos, comumente relacionada com obstruções coronarianas subtotais ou oclusões antigas mantidas por uma circulação colateral. As obstruções coronarianas agudas determinam alterações principalmente no segmento ST. Este achado eletrocardiográfico tem fundamental importância na classificação do AMI e reflete o fenômeno fisiopatológico, uma vez que lesões agudas com oclusão total da artéria estão associadas com o supradesnível do segmento ST e lesões com subtotal oclusão resultam no infradesnível do segmento ST. Entretanto, um percentual significativo de pacientes infartados não apresentam alterações no segmento ST do eletrocardiograma. Em vista disso, o emprego dos marcadores cardíacos no diagnóstico do AMI assume importância primordial para estratificação do risco e prognóstico dos pacientes (MENDIS et al., 2011; KURZ, MATTU & BRADY, 2014).

### 2.1.3 Marcadores cardíacos

Os marcadores cardíacos são descritos como moléculas proteicas da estrutura celular detectáveis na circulação sanguínea quando ocorrem lesões às células cardíacas (ALPERT et al., 2000; APPLE & MURAKAMI, 2005). A cinética de liberação dos marcadores cardíacos

no AMI depende de diversos fatores, tais como tamanho das moléculas, taxa de depuração do marcador, método analítico utilizado para sua medida e, sobretudo, de sua sensibilidade. Tradicionalmente, algumas enzimas citosólicas eram mensuradas como indicadores de isquemia cardíaca e infarto. Atualmente, outros marcadores bioquímicos constituintes proteicos da célula muscular e sem função enzimática também têm sido utilizados para esse propósito, apresentando diferentes graus de especificidade e sensibilidade (RAMASAMY, 2011; NICOLAU et al., 2014).

A enzima aspartato aminotransferase (AST, do inglês “*Aspartate Aminotransferase*”) foi descrita por KARMEN, WROBLEWSKI & LA DUE (1954) como primeiro marcador da injúria cardíaca utilizado para detecção de pacientes infartados. Os níveis da AST em soro apresentam elevação entre 3 a 8 horas após o aparecimento da lesão do miocárdio, com um pico de concentração em média às 24 horas e retorno aos níveis basais em 3 a 6 dias. Entretanto, a AST apresenta especificidade limitada para detecção de lesões cardíacas, sendo encontrada no coração, fígado, músculo esquelético, rins e cérebro, sendo atualmente utilizada como um marcador de doenças hepáticas. Outras pesquisas para determinação de um marcador padrão para detecção da isquemia miocárdica estimularam a descoberta e aplicação da lactato desidrogenase (LDH, do inglês “*Lactate Dehydrogenase*”) no diagnóstico do AMI (WROBLEWSKI & LA DUE, 1955). Apesar da LDH se manter elevada durante 10 a 14 dias após o infarto, seu uso como marcador cardíaco também mostrou-se inespecífico, uma vez que sua elevação pode ser indicativa de inúmeras condições clínicas, tais como, hipotireoidismo, hepatite aguda, infecções pulmonares e diversos tipos de carcinomas (DOLCI & PANTEGHINI, 2006).

Como alternativa a baixa especificidade das enzimas AST e LDH, a geração seguinte de marcadores cardíacos descreve a enzima creatina quinase (CK, do inglês “*Creatine Kinase*”) como marcador padrão para detecção de lesões musculares cardíacas causadas pelo AMI (ROSALKI, 1967). A CK é uma proteína citoplasmática que catalisa a fosforilação reversível de creatina em fosfocreatina, reação necessária para a contração muscular anaeróbia, comum no evento isquêmico. A CK é liberada rapidamente na corrente sanguínea e apresenta maior especificidade, quando comparado com a AST e LDH. Entretanto, a CK é extremamente sensível a danos da musculatura esquelética, permanecendo o problema da especificidade. O advento das técnicas de separação de proteínas por eletroforese permitiu a detecção de diferentes isoformas da enzima CK. Dentre estas, a isoenzima MB da CK (CK-MB, do inglês “*Creatine Kinase Muscle-Brain*”) mostrou-se predominante na musculatura cardíaca e aplicável para detecção de danos isquêmicos (NIGAN, 2007; ALDOUS, 2013). No

AMI, as concentrações CK-MB no plasma elevam-se num período de 3 a 8 horas após o início dos sintomas clínicos, atingindo um pico entre 12 a 24 horas e retornando aos níveis normais após 48 horas (YANG & ZHOU D, 2006). A CK-MB apresenta como principal limitação elevar-se após dano em outros tecidos não cardíacos (falsos positivos), especialmente após lesão em músculos lisos e esqueléticos. Contudo, a dosagem da massa de CK-MB em soro (CK-MB massa) por meio de imunoensaios é ainda utilizada como método de escolha para detecção de recidivas de infartos após 18 horas do evento inicial, em dosagens repetidas de 6 a 12 horas (ANTMAN et al., 2008).

A mioglobina é o marcador cardíaco que mais precocemente se altera e se normaliza na corrente sanguínea após uma lesão isquêmica. Os níveis séricos da mioglobina elevam-se entre 1 a 3 horas após o início da dor precordial e retornam aos níveis normais em 24 horas (GODET, BERNARD & BEN AYED, 2009). A mioglobina é uma proteína de baixo peso molecular (17 kDa) com estrutura semelhante à da hemoglobina, uma vez que também tem a capacidade de realizar o transporte de oxigênio. Apesar de demonstrar alta sensibilidade mediante a instalação do AMI, a mioglobina apresenta baixa especificidade pelo tecido cardíaco, principalmente em pacientes com insuficiência renal e traumas na musculatura esquelética (MCDONNELL et al., 2009). Adicionalmente, a rápida elevação e normalização dos níveis de mioglobina circulantes no soro podem diagnosticar indivíduos falso-negativos. Assim, a mioglobina deve ser sempre utilizada em associação com outros marcadores (APPLE et al., 2009).

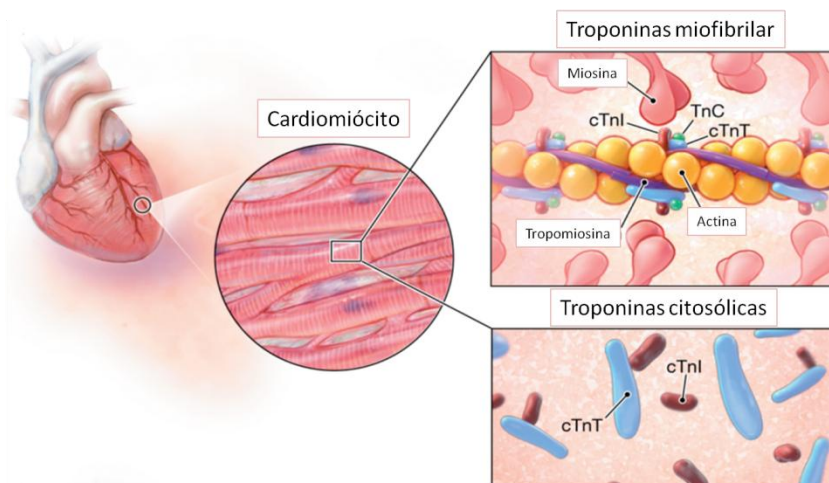
#### 2.1.4 Troponinas cardíacas

Atualmente, as troponinas cardíacas constituem os marcadores “padrão-ouro” para o diagnóstico de lesões isquêmicas do miocárdio. Devido à sua alta especificidade e sensibilidade passaram a ser consenso desde a primeira redefinição do AMI proposta por um comitê formado em 2000 pela Sociedade Europeia de Cardiologia e pelo Colégio Americano de Cardiologia (ALPERT et al., 2000; THYGESEN et al., 2007). Revisões posteriores do mesmo comitê consideraram também a importância da dosagem seriada das troponinas cardíacas, reiterando sua posição como marcador diferencial e de primeira escolha para o diagnóstico do AMI (THYGESEN et al., 2012<sub>a</sub>; THYGESEN et al., 2012<sub>b</sub>).

As troponinas são proteínas reguladoras que controlam a interação  $\text{Ca}^{2+}$  dependente entre os filamentos de actina e miosina, sendo responsáveis pelo ciclo dinâmico de contração

e relaxamento muscular. Reconhece-se três troponinas distintas, designadas pelas letras C (cTnC), T (cTnT) e I (cTnI) (**Figura 3**) (LEMOS, 2013).

**Figura 3.** Troponinas cardíacas C, T e I no aparato contrátil miofibrilar e sua distribuição nos cardiomiócitos.



FONTE: LEMOS, 2013.

No processo de contração após o impulso nervoso, o  $\text{Ca}^{+2}$  liberado dos retículos sarcoplasmáticos da célula cardíaca para o citoplasma liga-se à cTnC, resultando em uma mudança conformacional na cTnT. Esta alteração promove o movimento da tropomiosina e da cTnI, expondo os sítios de ligação entre a actina e miosina. As ligações cruzadas formadas na interação da actina com a miosina geram a força necessária para o desencadeamento da contração muscular (GUYTON & HALL, 2006).

As troponinas cTnT e cTnI são expressas como isoformas específicas à musculatura cardíaca, enquanto a troponina C é coexpressa tanto no músculo esquelético quanto cardíaco, tornando esta isoforma inadequada como marcador cardíaco (MUELLER et al., 2013; JAROLIM, 2014). Estruturalmente, as troponinas cardíacas encontram-se vinculadas ao aparato contrátil miofibrilar dos cardiomiócitos, entretanto, aproximadamente 7% da cTnT e 3 a 5% da cTnI estão livres no citoplasma. Após o dano e rompimento da membrana celular dos cardiomiócitos na necrose cardíaca, há um aumento inicial das concentrações de troponinas no soro que correspondem à liberação das proteínas livres no citoplasma, seguido da gradual dispersão das troponinas ligadas ao complexo contrátil miofibrilar, que permite o diagnóstico na fase aguda do infarto (LEMOS, 2013). As troponinas cardíacas na corrente sanguínea tornam-se mensuráveis num período compreendido de 2 a 4 horas após o início dos sintomas clínicos e mantêm-se elevadas por cerca de 4 a 7 dias para a cTnI, e 10 a 14 dias para a cTnT (JAFFE, BABUIN & APPLE, 2006; MORROW et al., 2007).

Aliado ao traçado eletrocardiográfico, a quantificação das troponinas permite cobrir uma parte importante das necessidades clínicas tanto na avaliação diagnóstica e estratificação do risco, quanto na orientação quanto à terapêutica. Visto que, na ausência de necrose miocárdica, as concentrações destas proteínas no plasma são indetectáveis (ALDOUS, 2013). Alguns autores atribuem à cTnI e cTnT a mesma especificidade e importância na avaliação dos danos cardíacos (PLEBANI & ZANINOTTO, 1999). Entretanto, para avaliar a extensão da lesão e tamanho do infarto, as concentrações de cTnT são as primeiras a se elevar após o início da dor pré-cordial (2 a 4 horas), ao passo que a cTnI aparece mais tardiamente (NICOLAU et al., 2014). Além disso, a cTnT apresenta uma janela diagnóstica mais ampla quanto comparado à cTnI, permitindo avaliar tanto a fase aguda como a crônica do AMI (LICKA et al., 2002; STEEN et al., 2006).

A cTnT é uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 37 kDa, produzida pelo gene TNNT2 (26875 bp). A sequência polipeptídica traduzida do gene TNNT2 compreende 288 aminoácidos, apresentando regiões ricas em resíduos de ácido glutâmico e lisina (WEI & JIN, 2011).

### 2.1.5 Métodos de detecção da cTnT usados na rotina clínica

#### 2.1.5.1 Imunoensaios

A alta especificidade dos anticorpos monoclonais pelos seus respectivos antígenos tem permitido, nas últimas décadas, o desenvolvimento de imunoensaios de alta especificidade diagnóstica. A introdução da dosagem da cTnT através de diversos tipos de imunoensaios na prática clínica tem possibilitado a detecção precoce de pequenas alterações desses marcadores na corrente sanguínea e correlação com os níveis de lesão do miocárdio (DAUBERT & JEREMIAS, 2010).

Os primeiros ensaios para detecção da cTnT basearam-se na utilização do ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) do tipo sanduíche, descritos por KATUS et al. (1989). Neste ensaio, dois anticorpos monoclonais, o primeiro cTnT específico e o segundo conjugado à enzima peroxidase, são utilizados para detecção indireta da cTnT através do uso de cromógenos.

Mais recentemente, foram propostos outros métodos de imunoensaios baseados em reações por eletroquimioluminescência (ECLIA, do “*Electrochemiluminescence Immunossay*”) para dosagem da cTnT. Estes são mais rápidos do que os ensaios

imunoenzimáticos e não limitados à cinética enzimática, sendo, portanto, mais sensíveis. Dentre estes, destaca-se o teste Elecsys® Troponin T STAT (Roche Diagnostics). O sistema de detecção do ECLIA utiliza compostos quimioluminescentes, tal como o rutênio, como marcador dos anticorpos monoclonais anti-cTnT. Assim, a intensidade da luminescência produzida pelo composto, quando aplicado uma determinada voltagem, é utilizada para quantificação da cTnT (TATE & PANTEGHINI, 2008). Embora analiticamente bem estabelecido na rotina clínica, o imunoensaio descrito ainda apresenta limitações para aplicação como testes à beira do leito, uma vez que, os testes de determinação de marcadores cardíacos precisam ser eficientemente práticos e rápidos, dado a urgência da terapêutica necessária no diagnóstico do AMI.

Sistemas mais práticos e portáteis para determinação da cTnT à beira do leito têm sido desenvolvidos empregando testes de tira com fluxo lateral baseados em ensaios imunocromatográficos, tais como o Cardiac POC Troponin T® (Roche Diagnostics). O princípio deste método baseia-se na interação da cTnT circulante da amostra do paciente com anticorpos anti-cTnT conjugados à partículas de ouro coloidal em uma membrana de nitrocelulose (CHRISTENSON & AZZAZY, 2009). Embora simples, os testes de tira lateral apresentam apenas informações qualitativas e/ou semi-quantitativas, impossibilitando inferir sobre o dano e a extensão da lesão cardíaca. Portanto, faz-se necessário o incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias para quantificação da cTnT no diagnóstico do AMI, com o objetivo de diminuir o tempo de execução e os custos do ensaio, sem perder a especificidade e a sensibilidade dos métodos convencionais.

## **2.2 Biossensores**

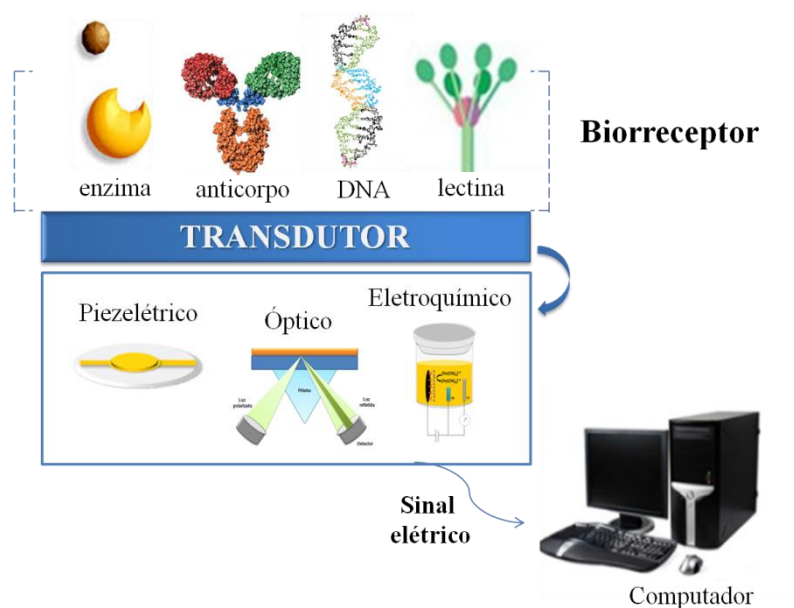
O desenvolvimento de dispositivos bioanalíticos tem ganhado espaço e colaborado na elucidação de fenômenos bioquímicos e biológicos sobre um determinado analito de importância clínica, farmacêutica ou ambiental (BERTÓK et al., 2013). O estudo pioneiro de CLARK & LYONS (1962) na determinação da glicose, através de um sistema de sensoriamento, abre as primeiras perspectivas no desenvolvimento de biossensores comercializáveis, oferecendo uma alternativa potencial aos sistemas tradicionais.

Nos últimos anos, a indústria de biossensores vem testemunhando grandes avanços na incorporação destes dispositivos em aplicações clínicas e não clínicas. De acordo com pesquisas, o mercado de biossensores foi avaliado em 11,39 bilhões de dólares em 2013 e espera-se alcançar 22,68 bilhões de dólares em 2020. O aumento da demanda destes testes

diagnósticos, principalmente na forma de pronto atendimento ou à beira do leito, são os principais impulsionadores do crescimento do mercado, devido à crescente prevalência de algumas doenças, tais como diabetes e CVDs, envelhecimento da população e a necessidade de melhoramento da atual infraestrutura de saúde (MARKETS AND MARKETS, 2015).

Os biossensores são descritos como dispositivos bioanalíticos composto por duas partes, uma biológica (sensora) e outra eletrônica (transdutor), que integradas são capazes de detectar um analito específico quantitativamente e/ou semi-quantitativamente (KIMMEL et al., 2012). O elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) liga-se de forma específica ao analito sobre uma superfície sensora, onde ocorrem as interações bioquímicas específicas, resultando em um sinal passível de quantificação. Este sinal é convertido e amplificado pelo elemento transdutor em um sinal elétrico, cuja magnitude é proporcional à concentração do analito de interesse. Os dados são processados, por um software e convertidos em um parâmetro significativo (**Figura 4**) (LUZ, IOST & CRESPIHO, 2013).

**Figura 4.** Representação esquemática dos componentes de um biossensor.



Adaptado de: ARUGULA & SIMONIAN, 2014.

Diferentes transdutores podem ser utilizados em biossensores, a escolha deles dependerá do componente biológico imobilizado na superfície sensora e das propriedades de cada amostra de interesse. De acordo com o princípio de energia envolvida, os transdutores em biossensores podem ser classificados em acústico ou piezelétrico, óptico e eletroquímico (RABA et al., 2013).

Os transdutores acústicos detectam variações das frequências de ondas acústicas geradas por cristais piezelétricos em resposta à interação biomolécula-analito. Neste tipo de transdução, o cristal piezelétrico é submetido a um campo elétrico alternado que modifica o estado vibracional de oscilação harmônica do cristal, gerando uma onda acústica mensurável, comportando-se como uma microbalança para detecção da interação biomolécula-analito. As variações de frequência das ondas acústicas são, então, proporcionais à quantidade de material adsorvido no evento de bioreconhecimento (PERUMAL & HASHIM, 2014; LUZ, IOST & CRESPIHO, 2013).

Os transdutores ópticos baseiam-se nas variações da resposta aos estímulos de luz como consequência da interação do analito de interesse com o elemento biológico. De acordo com o mecanismo de detecção, a quantificação do analito neste tipo de transdução é realizada através de medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes e fosforescentes. Uma variedade de sistemas ópticos tem sido utilizada nestes tipos de transdução, tais como diferentes tipos de espectroscopias (fluorescência, Raman, entre outras), interferometria e os sistemas de ressonância de plasmon de superfície (SPR, do inglês "*Surface Plasmon Resonance*") (ABDULHALIM, ZOUROB & LAKHTAKIA, 2007; ABDULHALIM, ZOUROB & LAKHTAKIA, 2008).

Os transdutores eletroquímicos têm se destacado entre os tipos de transdutores mais empregados em biossensores. O princípio deste sistema de transdução baseia-se na mensuração de variações de uma propriedade elétrica resultante da interação analito-bioreceptor. De acordo com a propriedade elétrica explorada, a detecção eletroquímica pode ser (i) *amperométrica*, medindo-se a corrente elétrica produzida por movimento de espécies eletroativas na superfície sensora quando o sistema é submetido a um potencial controlado; (ii) *potenciométrica*, medindo-se a diferença de potencial decorrente do acúmulo ou depleção de íons na interface sensora submetido a uma fonte de corrente constante ou corrente zero; (iii) *condutimétrica*, medindo-se mudanças na condutância da superfície eletródica resultante de produtos de reações catalíticas; ou (iv) *impedimétrica*, medindo-se mudanças da impedância do meio decorrente de uma perturbação senoidal de corrente ou de potencial na superfície sensora (STRADIOTTO, YAMANAKA, & ZANONI, 2003; CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Diferentes moléculas biológicas podem ser empregadas como biorreceptores em biossensores, subdividindo estes de acordo com o tipo de interação bioquímica envolvida no reconhecimento do analito. Os biossensores catalíticos utilizam enzimas eletroativas como elemento de reconhecimento, sendo caracterizados por mensurar produtos resultantes da

bioatividade enzimática na presença do seu substrato específico (RABA et al., 2013). Os biossensores de afinidade baseiam-se na formação de complexos entre o substrato e o receptor. Entre os sistemas de bioafinidade destacam-se as interações antígeno-anticorpo, lectina-carboidrato e a hibridização entre sequências de ácidos nucleicos de fita simples (BERTÓK et al., 2013; PERUMAL & HASHIM, 2014). Outra classe de biossensores utiliza biorreceptores sintéticos construídos na tentativa de mimetizar a seletividade das interações biológicas enzima-substrato, antígeno-anticorpo e fármaco-receptor (MUJAHIND, IQBAL & AFZAL, 2013).

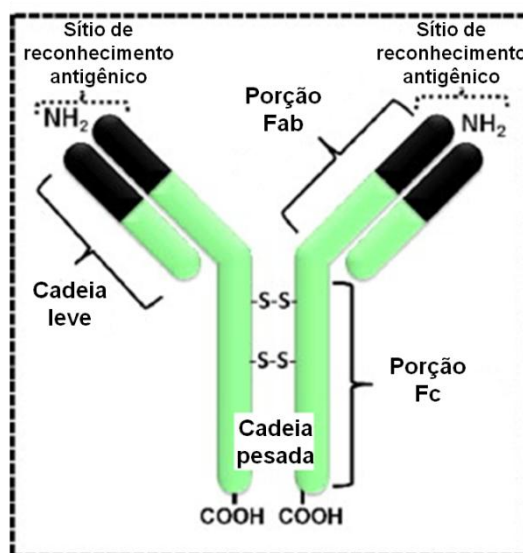
### 2.2.1 Imunossensores

A especificidade do reconhecimento molecular entre antígenos e anticorpos na formação de um complexo estável é o principal fundamento para o desenvolvimento de dispositivos analíticos baseados em imunoenaios (YAMANAKA & FERREIRA, 2006). Os biossensores que exploram esta interação designam-se imunossensores. A alta afinidade da interação do anticorpo ao seu alvo antigênico, principalmente quando monoespecífico, associada aos sistemas transdutores, possibilita a aplicação dos imunossensores para detecção de diferentes analitos com alta seletividade e sensibilidade (LI et al., 2013; GOPINATH et al., 2014).

Os anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas, chamadas imunoglobulinas (Ig), responsáveis por desencadear o mecanismo de defesa imunológica específica em resposta à presença de um dado antígeno. Existem cinco classes distintas de glicoproteínas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE), sendo a IgG a classe mais abundante (aproximadamente 70%) e mais frequentemente utilizada em técnicas imunoanalíticas (ZHANG, JU & WANG, 2008). A estrutura básica da IgG é constituída por duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (55 a 75 kDa), ligadas entre si por pontes de dissulfeto (-S-S-), e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (25 kDa), que formam uma estrutura característica em Y (**Figura 5**) (KRYSCIO & PEPPAS, 2012). A porção amino-terminal, localizada no topo da estrutura em Y, encontram-se os sítios de fragmentos ligadores de antígenos ( $F_{ab}$ , do inglês “*Fragment antigen binding*”). Esta região, chamada de paratopo, possui sequências variáveis de aminoácidos específicos para uma porção particular do antígeno, denominado epítopo, determinando assim sua especificidade. Já na porção carboxi-terminal encontra-se a fração constante da Ig ( $F_c$ , do inglês “*Fragment constant*”), responsável pela regulação da resposta imune (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012). Em geral, os anticorpos possuem alto peso molecular e diâmetro médio de 10 a 40 nm (KRYSCIO & PEPPAS, 2012).

Semelhantemente aos imunoenaios convencionais, os imunossensores são baseados nos princípios dos imunoenaios em fase sólida, no qual o sinal gerado é resultante da captura do antígeno ou do anticorpo pelo dispositivo sensor e, em alguns casos, promovido por algum tipo de molécula auxiliar marcadora acoplada. A interação antígeno-anticorpo é acompanhada por pequenas alterações físico-químicas, envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas e forças de van der Waals (FARRÉ, KANTIANI & BARCELO, 2007).

**Figura 5.** Modelo esquemático da estrutura molecular do anticorpo da classe IgG, demonstrando a presença das cadeias leves e pesadas, subdivididas em porção  $F_c$  e  $F_{ab}$ , e os sítios de reconhecimento antigênico.



FONTE: GOPINATH et al., 2014.

Com relação ao tipo de resposta pretendida, os imunossensores são classificados em marcados e não marcados. Os imunossensores marcados descritos na literatura exploram o princípio dos imunoenaios dos tipos competitivo e sanduíche que utilizam enzimas, fluoróforos e nanopartículas como marcadores. Apesar de seletivo, este método implica em elevados custos operacionais, incluindo aumento das etapas de processamento da amostra (RAPP, GRUHL & LÄNGE, 2010; GOPINATH et al., 2014).

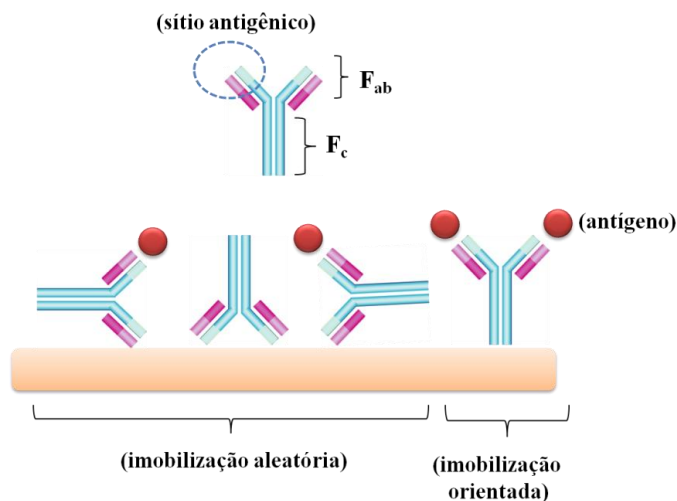
Nos ensaios livres de marcador (*“label-free”*) a resposta do imunossensor é obtida diretamente após o evento de biorreconhecimento. Neste tipo de ensaio, a interação antígeno-anticorpo na superfície sensora pode ser obtida através do monitoramento de mudanças físicas, tais como o índice de refração em sistemas de SPR (ABDULHALIM, ZOUROB & LAKHTAKIA, 2008), alterações de massas, em transdutores piezelétricos utilizando uma microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês *“Quartz Crystal Microbalance”*)

(MATTOS et al., 2012), e propriedades elétricas em transdutores eletroquímicos (BACKMAN et al., 2005). Em particular, os transdutores eletroquímicos têm se destacado no desenvolvimento de imunossensores livres de marcação, devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e compatibilidade com as tecnologias de microfabricação de sensores.

### 2.2.1.1 Imobilização de anticorpos

A escolha do método de imobilização dos anticorpos é um aspecto crítico no desenvolvimento de imunossensores, visto que a manutenção da capacidade de reconhecimento antigênico e especificidade dos anticorpos podem influenciar diretamente a sensibilidade analítica do dispositivo. Como demonstrado na **Figura 6**, a disposição dos sítios antigênicos sobre a superfície sensora mostra claramente como a orientação afeta a densidade superficial de anticorpos imobilizados e a interação de biorechecimento. A imobilização aleatória dos anticorpos dificulta a exposição adequada dos sítios antigênicos, afetando a interação antígeno-anticorpo sobre a superfície sensora (TRILLING, BEEKWILDER & ZUILHOF, 2013). Atualmente, dois métodos de imobilização empregando ligações covalentes e não covalentes são utilizados na construção de imunossensores.

**Figura 6.** Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a superfície sensora.



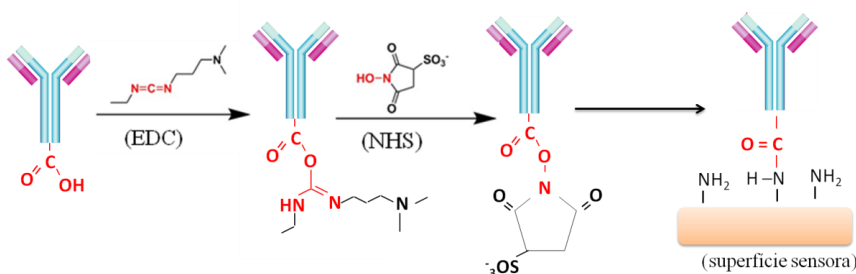
FONTE: Elaborada pelo autor.

A imobilização não covalente de anticorpos por adsorção física explora principalmente ligações fracas, tais como ligações iônicas, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e forças de van der Waals. Embora bastante tradicional devido à simplicidade, o método de adsorção física possibilita baixo controle sobre a conformação da molécula na superfície sensora. Além

disso, as forças de interação são suscetíveis às mudanças de pH, temperatura e força iônica do meio (JUNG, JEONG & CHUNG, 2008).

A imobilização de anticorpos por ligação covalente é o método estável de biofuncionalização de superfícies em imunossensores. Neste método, a utilização de grupos químicos mutuamente reativos pode-se obter um controle mais preciso da orientação do anticorpo sobre a superfície sensora. A maioria dos trabalhos da literatura explora a reatividade de grupos funcionais presentes nas cadeias de aminoácidos do anticorpo, tais como grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), tiol ( $-\text{SH}$ ), hidroxílicos ( $-\text{OH}$ ) e carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ). Em particular, grupos carboxílicos presentes na porção  $\text{F}_c$  do anticorpo podem ser utilizados estrategicamente para imobilização covalente sítio específica e orientada. Os grupos carboxílicos podem reagir com superfícies amino funcionalizadas quando previamente ativados com *N*-etil-*N*-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxi-succinamida (NHS), formando ligações amidas (REDEKER et al., 2013) (**Figura 7**). Nesta reação, o EDC reage com o grupo carboxílico formando um éster reativo, *o*-acril-*isouréia*. Entretanto, a reação deste composto com os grupos amino na superfície sensora é lento, podendo o acoplamento não ocorrer. Assim, o NHS proporciona o aumento do rendimento da reação através do ataque nucleofílico formando um éster intermediário bastante reativo, e consequente formação de uma ligação amida estável entre o anticorpo e a superfície sensora. A reação EDC/NHS é dependente do pH para maximização as forças eletrostáticas entre a biomolécula e a carga negativa dos grupos carboxílicos (SEHGAL & VIJAY, 1994; ERICSSON, 2013).

**Figura 7.** Reação de ativação dos grupos carboxílicos do anticorpo via EDC/NHS para imobilização orientada sobre uma superfície sensora.



Adaptado de: ERICSSON, 2013.

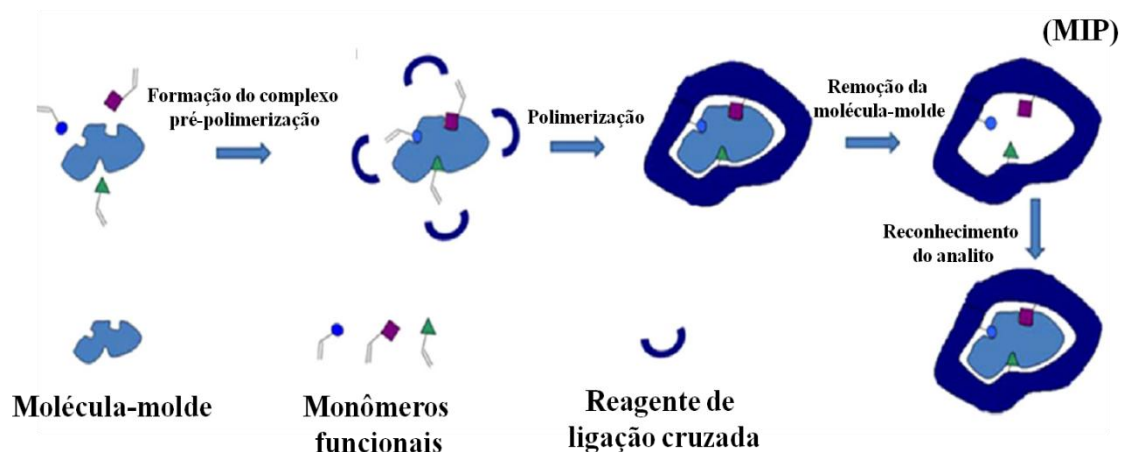
### 2.2.2 Sensores biomiméticos

O reconhecimento molecular específico representa um aspecto fundamental no desenvolvimento de ensaios bioanalíticos. Embora os biorreceptores naturais apresentem excelente seletividade, alguns aspectos tais como alto custo de produção e utilização sobre condições moderadas limitam sua aplicabilidade, estabilidade e reprodutibilidade analítica (DING & HEINDEN, 2014). A partir desta perspectiva, a técnica de impressão molecular é uma alternativa vantajosa para superação dos problemas associados às moléculas biológicas, tais como enzimas, anticorpos e proteínas ativas. O princípio deste método parte da compilação de teorias bioquímicas, no qual uma molécula alvo se porta como um padrão para modelagem para uma segunda molécula, esta apresentando configurações complementares seletivas, tais como o modelo encaixe induzido entre uma enzima e seu substrato e a interação complementar específica do anticorpo com seu respectivo antígeno (IRSHAD et al., 2013; VOLKERT & HAES, 2014).

Entre as diferentes abordagens utilizadas para produzir esses sistemas artificiais, os polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês “*Molecularly Imprinted Polymers*”) têm recebido atenção em numerosos campos analíticos. O MIP é descrito como uma matriz polimérica rígida contendo a impressão em três dimensões de uma determinada molécula. No processo de construção deste tipo de receptor, quatro elementos fundamentais são necessários: i) a *molécula alvo* que será impressa; ii) os *monômeros funcionais*, compostos químicos utilizados como modelo de complementaridade; iii) o *reagente de ligação cruzada*, responsável pela reticulação dos monômeros e formação da cadeia polimérica e iv) o *solvente porogênico*, responsável por solubilizar os reagentes de síntese e auxiliar na formação dos poros das cavidades miméticas (IRSHAD et al., 2013).

Inicialmente no processo de síntese, a molécula molde interage com os monômeros funcionais, formando um complexo de pré-polimerização. Os monômeros funcionais se organizam em torno da molécula molde, delineando os locais de reconhecimento. Em seguida, o arranjo formado pelos monômeros em torno da molécula molde é polimerizado através da reação com o reagente de ligação cruzada. Após a etapa de polimerização, a molécula é removida da matriz polimérica produzindo cavidades de memória molecular similar à molécula molde (**Figura 8**). Os MIPs resultantes são estáveis, robustos e resistentes às condições experimentais extremas e o seu comportamento simula as interações seletivas estabelecidas pelos receptores no reconhecimento da molécula molde (MUJAHIND, IQBAL & AFZAL, 2013).

**Figura 8.** Representação das principais etapas do processo de síntese dos MIPs.



FONTE: HUYNH & KUTNER, 2015.

Uma das principais etapas na síntese de MIPs consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do monômero e do analito. A molécula molde necessita conter em sua estrutura grupos funcionais capazes de interagir com os monômeros, a fim de formar um complexo estável. A interação molécula-monômero pode ser mediada por ligações covalentes ou interações não covalentes (pontes de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou interação hidrofóbica). Em geral, MIPs obtidos por ligações covalentes apresentam dificuldades para remoção da molécula molde e sítios miméticos com uma cinética de ligação lenta. Uma variedade de monômeros pode ser explorada em MIPs derivados de interações não covalentes, apresentando grande versatilidade na estruturação das cavidades biomiméticas. Este tipo de MIP pode ser obtido mais facilmente comparado à MIPs de ligação covalente. Além disso, a molécula molde em MIPs de interações não covalentes é removida sobre condições mais brandas, preservando melhor a seletividade das cavidades biomiméticas (IRSHAD et al., 2013).

Os MIPs vêm sendo amplamente empregados em processos de extração e microextração em fase sólida, em técnicas de separação, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, eletrocromatografia capilar e cromatografia em camada delgada visando, principalmente, a separação de espécies (TARLEY, SOTOMAYOR & KUBOTA, 2005). A síntese dos MIPs é relativamente barata, sendo uma importante ferramenta na construção de modelos biomoleculares sintéticos aplicáveis em bioensaios e biossensores.

### 2.2.2.1 Métodos de obtenção de MIPs de proteínas em sensores

O desenvolvimento de MIPs para compostos de baixo peso molecular tais como fármacos é hoje bem estabelecido, entretanto para proteínas ainda é um desafio, devido ao seu tamanho molecular e estrutura complexa. Além disso, as proteínas podem modificar sua estrutura conformativa a qual depende do ambiente circundante, levando a uma impressão de uma matriz polimérica incompatível (KRYSCIO & PEPPAS, 2012; CHEN et al., 2014). Assim, um cuidado especial deve ser tomado durante a seleção das condições experimentais, incluindo também a forma como o MIP é integrado à superfície sensora.

MIPs de proteína em biossensores podem ser obtidos através de diferentes abordagens que variam a partir do alvo a ser impresso (proteína total ou apenas uma região) e da forma como a polimerização é conduzida (HENRY, PILETSKY & CULLEN, 2008). Tradicionalmente, os MIPs são sintetizados através do processo de polimerização “in bulk” no qual a reação é realizada em um sistema homogêneo, contendo os monômeros funcionais, a molécula molde, o solvente porogênico e o reagente de ligação cruzada, na ausência de oxigênio. A etapa de polimerização é induzida por aquecimento e/ou radiação UV. Os MIPs obtidos por este método, em geral, apresentam partículas com formatos irregulares e tamanhos variados, que dificultam a remoção adequada da molécula molde na matriz polimérica (MARESTONI et al., 2013).

Novas concepções de preparo dos MIPs de proteínas a partir do método de impressão em superfície (“*surface imprinting*”) vêm sendo empregadas utilizando procedimentos experimentais mais simples quando comparado à polimerização “in bulk”. A impressão em superfície de MIPs, através da polimerização dos monômeros e da molécula molde diretamente sobre uma superfície suporte, permite a obtenção de cavidades biomiméticas dentro de finos filmes poliméricos. Neste sistema, a remoção da proteína pode ser realizada de forma mais uniforme, contribuindo para a obtenção de cavidades mais seletivas e reprodutíveis (VOLKERT & HAES, 2014).

Diferentes abordagens técnicas podem ser utilizadas para construção de MIPs empregando o método de impressão em superfície, tais como “stamp-coating”, “polymer-brush imprinting”, “surface grafting” e polimerização eletroquímica. Na técnica de “stamp-coating”, a proteína é estampada em um filme pré-molde, polimerizável quando submetido a uma determinada temperatura. Embora simples, a técnica depende fortemente do controle da viscosidade do filme pré-molde no qual a molécula será impressa (SCHIRHAGL, REN & ZARE, 2012).

A técnica “polymer-brush imprinting” foi introduzida por ZDYRKO et al. (2009), na qual a molécula molde é inicialmente ancorada a uma camada reativa polimérica e em seguida, os espaços circundantes entre as moléculas adsorvidas são preenchidos com uma segunda camada de polímero. Assim, o evento de reconhecimento é baseado principalmente no tamanho da cavidade impressa (SCHIRHAGL, REN & ZARE, 2012).

Na técnica de “surface grafting”, a polimerização é realizada após interação da proteína molde com os grupos funcionais de monômeros sobre um suporte sólido, formando uma fina película impressa (SCHIRHAGL, REN & ZARE, 2012). A polimerização eletroquímica combina o conceito da técnica de “surface grafting”, com as ferramentas eletroanalíticas, possibilitando a simples obtenção de MIPs com características diferenciadas, uma vez que os parâmetros eletroquímicos de síntese podem ser convenientemente controlados, tais como controle do número de ciclos, velocidade de polimerização, corrente e potencial aplicado (SHARMA et al., 2012).

O mecanismo da polimerização eletroquímica envolve reações de oxidação ou redução dos monômeros funcionais sobre potenciais específicos e subsequente reação de polimerização. A síntese eletroquímica dos MIPs é realizada, principalmente, através das técnicas de cronopotenciometria, cronoamperometria, voltametria cíclica e voltametria linear, na qual se aplica um potencial ou janela de potenciais de varredura para eletropolimerização dos monômeros (PESAVENTO et al., 2009; SHARMA et al., 2012).

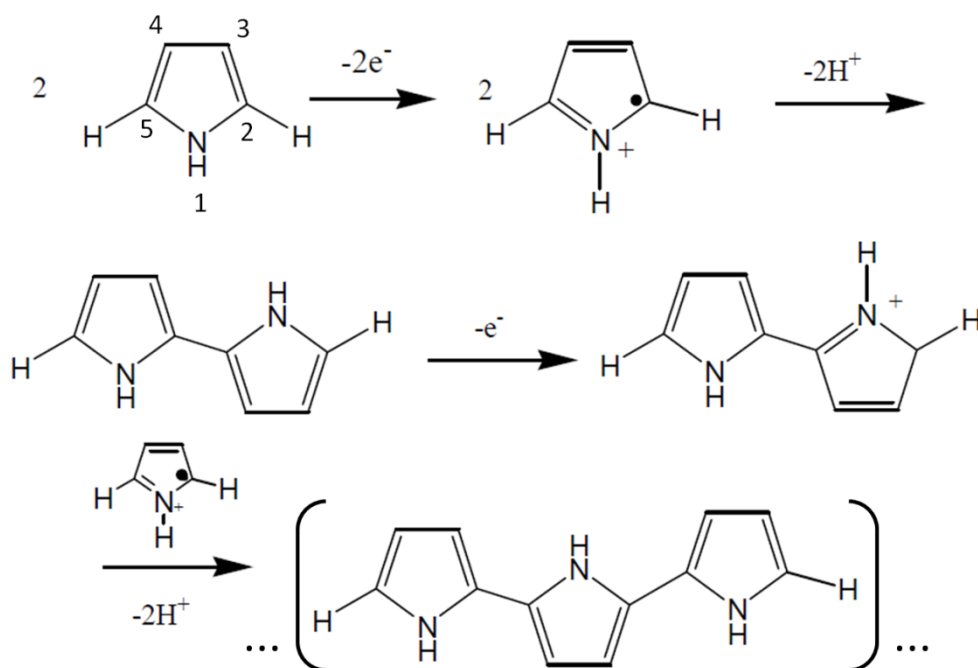
#### 2.2.2.2 Sensores biomiméticos baseados em polímeros condutores

O método de impressão em superfície em MIPs facilita, principalmente, a remoção da molécula molde de forma mais eficiente. A proximidade das cavidades biomiméticas impressas sobre a superfície sensora contribui também para uma melhor transferência de elétrons nos eventos de reconhecimento (PRASAD et al., 2013; CABRAL-MIRANDA, GIDLUND & SALES, 2014; MOREIRA et al., 2014). No entanto, essas características são por vezes limitadas pelo emprego de polímeros não condutores na construção da matriz biomimética. Neste sentido, alguns polímeros condutores foram descritos como matriz polimérica em MIPs, tais como o polipirrol (PPy, do inglês “*Polypyrrole*”) (NEZHADALI, PIRAYESH & SHADMEHRI, 2013), politiofeno (HUYNH et al., 2013), polianilina (XUE et al., 2014) e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (GRANADO et al., 2014). Dentre estes, o PPy é um candidato atraente para a obtenção de MIPs de proteína empregando o método de impressão em superfície, devido à sua fácil síntese eletroquímica, alta condutividade e boa

biocompatibilidade. Adicionalmente, a utilização de derivados monoméricos do pirrol (Py, do inglês “*Pyrrole*”) com grupos químicos funcionais destaca-se como uma estratégia para aprimorar a interação com a biomolécula molde durante a formação das cavidades biomiméticas (KIM, YANG & PARK, 2015).d

O Py é um composto heterocíclico de caráter aromático, extremamente reativo devido à alta densidade eletrônica do anel. A obtenção via polimerização eletroquímica do PPy (**Figura 9**), inicia-se através da oxidação dos compostos monoméricos em potenciais específicos, culminando com a formação de um radical catiônico extremamente reativo. Este radical reage com outro radical catiônico monomérico, através do acoplamento oxidativo nas extremidades 2 e 5 do anel aromático, liberando dois prótons. Nesta etapa, contra-íons são incorporados ao cátion-radical para neutralizar a carga do sistema. A propagação da cadeia segue a seguinte sequência: oxidação, acoplamento e liberação de prótons, formando oligômeros e posteriormente polímero (GUIMARD, GOMEZ & SCHIMIDT, 2007; SINGH, KATHUROJU & JAMPANA, 2009; DAS et al., 2009).

**Figura 9.** Síntese eletroquímica do PPy.



FONTE: DAS et al., 2009.

### 2.2.2.3 Técnicas de remoção da molécula molde

A remoção da molécula molde incorporada na matriz polimérica dos MIPs é um aspecto essencial para a manutenção da analogia estrutural das cavidades miméticas. Para um procedimento de extração eficaz deve-se evitar submeter à matriz do MIP às condições extremas de pH ou temperatura por longo período, uma vez que estas condições podem desestruturar ou mesmo romper a cavidade mimética, resultando em MIPs com baixa seletividade. A extração completa da molécula molde requer lavagens extensivas utilizando solventes com alto poder de eluição, tais como soluções aquosas de metanol ou etanol, contendo ácidos ou bases (LORENZO et al., 2011). Na literatura são descritos diversos métodos de extração da molécula molde para MIPs produzidos “in bulk”, dentre os quais se destacam a extração Soxhlet e remoção física por micro-ondas e ultrassom.

A extração Soxhlet é um dos mais tradicionais métodos usados em MIPs. Na extração Soxhlet, o solvente de extração é aquecido, volatiliza e condensa, submergindo as partículas sólidas de MIP, finamente triturada em uma câmara de extração do aparelho Soxhlet. O produto liberado deste processo é composto basicamente pelo solvente e a molécula molde. Os vapores de solvente recirculam através das partículas de MIP por várias horas, sendo uma extração contínua e relativamente demorada (LUQUE & PRIEGO-CAPOTE, 2010; LORENZO et al., 2011).

O método de extração física utiliza, principalmente, micro-ondas e ultrassons com o objetivo de remover a molécula molde da matriz polimérica. A extração por micro-ondas explora solventes com propriedades de absorção de ondas eletromagnéticas e subsequente liberação de temperatura para extrair termicamente a molécula molde (MANDAL, MOHAN & HEMALATHA, 2007). A extração por ultrassom tem como princípio o efeito da cavitação sobre os solventes de extração. Após a extração, as partículas de MIP podem ser separadas do solvente por centrifugação ou filtração (SVENSON, 2006). Os métodos descritos utilizam uma quantidade pequena de solvente e consomem menos tempo de extração (30-60 min) quando comparado aos métodos tradicionais (LORENZO et al., 2011).

Em se tratando de MIPs obtidos por impressão em superfície, o cuidado com a superfície eletródica deve ser adotado com o objetivo de evitar a desestabilização das cavidades biomiméticas. Neste tipo de abordagem, o método de incubação com solventes tem sido utilizado. A técnica envolve a simples imersão do MIP de superfície em reagentes ácidos ou básicos, que favorecem a dissociação da molécula molde. Geralmente, este método é realizado sobre condições brandas, com o objetivo de preservar a estabilidade do polímero,

sendo facilmente adaptável a diferentes condições laboratoriais (LORENZO et al., 2011). Mais recentemente, MOREIRA et al. (2014) tem destacado outras abordagens de extração por incubação, utilizando enzimas proteolíticas em substituição aos tradicionais solventes, com o objetivo de acelerar a taxa de remoção e permitir um maior rendimento de cavidades miméticas derivadas de proteínas.

## **2.3 Novas tendências em plataformas sensoras**

Recentemente, o desenvolvimento de sensores para imunoensaios tem destacado a importância de oferecerem dispositivos mais simplificados e adaptados quanto ao tamanho e configuração, para facilitar a coleta e análise em campo do analito de interesse. A necessidade de desenvolvimento de plataformas sensoras descartáveis também é impulsionada pela restrição ao uso contínuo dos eletrodos metálicos ou à base de carbono convencionais, devido à passivação ou degradação da superfície sensora, exigindo a execução de procedimentos de limpeza laboriosos. Assim, a adaptação dos métodos tradicionais a sistemas miniaturizáveis tem como objetivo facilitar o monitoramento remoto e reduzir os custos do diagnóstico (TSOUTI et al., 2011). Embora nenhuma tecnologia tenha sido ainda aceita como majoritária na elaboração de eletrodos descartáveis, o uso de eletrodos impressos (SPEs, do inglês “*Screen-Printed Electrode*”) vem crescendo em popularidade e atendendo à demanda deste mercado, particularmente devido à sua simplicidade e baixo custo (BERGAMINI, OLIVEIRA & ZANONI, 2005; METTERS, KARARA & BANKS, 2011).

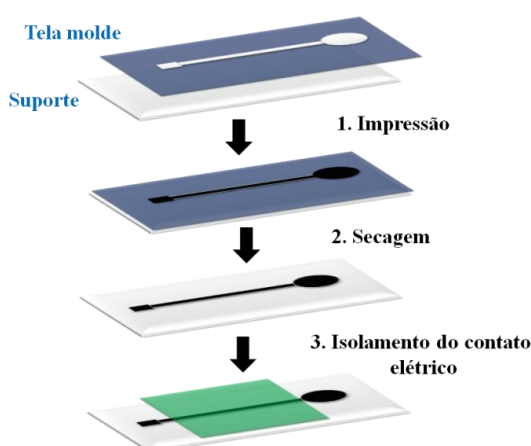
### **2.3.1 Eletrodos impressos**

A tecnologia de SPE tem sido adaptada da indústria de microeletrônica, através da confecção de componentes eletrônicos como capacitores, resistores e condutores em circuitos impressos, para produção em massa de eletrodos portáteis e descartáveis, aplicáveis em sistemas de sensoriamento. O potencial destes dispositivos para aplicação comercial pode ser demonstrado atualmente através dos “tips” sensores de mono uso utilizados para determinação da glicemia de indivíduos diabéticos, empregando glicosímetros (TALEAT, KHOSHROO & MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

O processo de confecção dos SPEs é baseado na deposição de finos filmes condutores sobre substratos inertes. A impressão do filme é feita através de uma tela molde em contato com o substrato, no qual o filme é depositado pela transferência do padrão do molde, podendo

ser realizada manualmente ou automaticamente (**Figura 10**). A etapa final de confecção dos SPEs consiste na aplicação de uma camada parcial de um isolante para definir uma área a ser usada como contato elétrico. Os substratos mais utilizados para confecção dos SPEs são materiais com elevada inércia química e eletroquímica, tais como cerâmicas e materiais à base de plástico (NASCIMENTO & ANGNES, 1998; FANJUL-BOLADO et al., 2008; TALEAT, KHOSHROO & MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

**Figura 10.** Esquema do processo de confecção de um SPE.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Entre as principais vantagens oferecidas pelos SPEs pode-se destacar a diversidade de possibilidade de materiais de impressão, portabilidade, fácil integração com circuitos eletrônicos, produção em larga escala e baixo custo. Adicionalmente, devido às dimensões miniaturizadas dos SPEs, todas as etapas do ensaio podem ser realizadas em única gota, usando poucos microlitros da solução, consequentemente, reduzindo o consumo de reagentes e a complexidade do aparato laboratorial utilizado para realização do diagnóstico. A possibilidade de automação, através da confecção de um sistema completo torna os SPEs extremamente atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores comerciais. Consequentemente, esta tecnologia tem mostrado grande versatilidade para aplicações tanto na configuração de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), quanto na configuração única (apenas trabalho) (RICCI et al., 2007; TALEAT, KHOSHROO & MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

A escolha da tinta de impressão usada como eletrodo de trabalho é uma etapa crítica no desenvolvimento dos SPEs, pois sua composição pode reduzir a reatividade e reprodutibilidade do eletrodo. Em geral, tintas à base de carbono são as mais utilizadas na

confecção dos eletrodos impressos, uma vez que apresentam uma baixa corrente residual, contribuindo na redução de ruídos, fácil obtenção e baixo custo (GORNALL, COLLYER & HIGSON, 2009; LI et al., 2012).

WRING et al. (1990), em um trabalho pioneiro, descreve a produção de eletrodos de carbono impressos, através da preparação de uma mistura de pó de grafite, acetato de celulose e acetona, serigraficamente impressa sobre a superfície do policloreto de polivinila. Tintas de carbono, em geral, são compostas por partículas de grafite, polímeros aglutinantes e outros aditivos. Diferenças na composição das tintas (tipo, tamanho e carga das partículas de grafite), impressão, condições de cura e pré-tratamento podem afetar a transferência de elétrons e o desempenho analítico dos SPEs (GORNALL, COLLYER & HIGSON, 2009).

A flexibilidade de adaptação dos SPEs às diferentes formas de modificação permite o aprimoramento contínuo das características destes sensores. Os SPEs podem ser facilmente modificados através da adição de materiais funcionais à matriz de impressão, tais como mediadores, moléculas biológicas, polímeros, etc, ou através da modificação direta da superfície sensora (CAI et al., 2009). O uso de nanomateriais como agentes modificadores do processo de confecção dos SPEs tem possibilitado a obtenção de sistemas mais reprodutíveis e sensíveis. Estes materiais podem promover o aumento da área reativa, consequentemente, da quantidade de moléculas imobilizadas e ampliar a transferência de elétrons, contribuindo para um aumento da sensibilidade na detecção do evento de reconhecimento (LI et al., 2012; MISTRY et al., 2014).

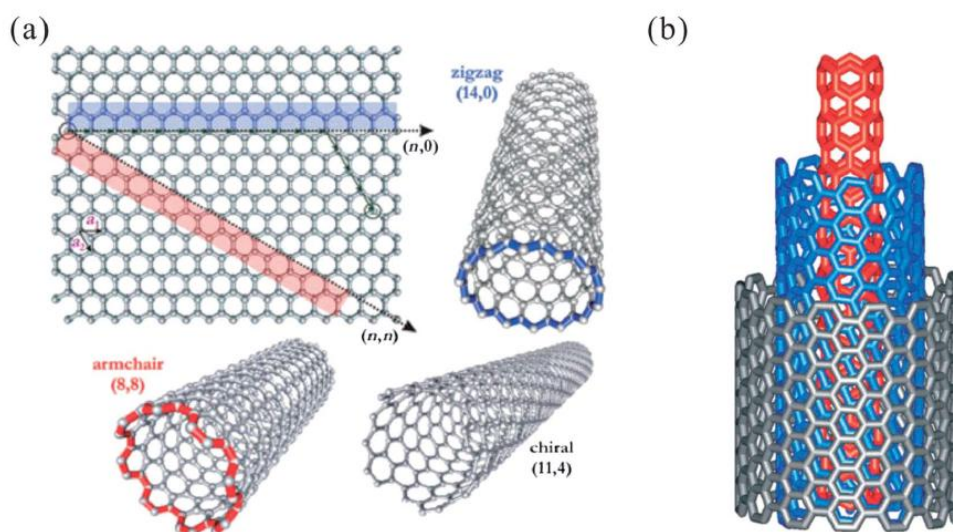
### 2.3.2 Nanomateriais de carbono

Com o progresso da nanotecnologia, uma diversidade de nanomateriais tem sido utilizada como modificadores do filme impresso ou da superfície dos SPEs para aplicação em imunoensaios. Em particular, nanomateriais de carbono, tais como nanotubos de carbono (CNTs, do inglês “*Carbon Nanotubes*”) e grafeno (GR, do inglês “*Graphene*”), têm se destacado como alguns dos nanomateriais mais interessantes na área eletroquímica e eletroanalítica nos últimos anos, devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas (GE et al., 2014).

Descritos pela primeira vez por IJIMA, em 1991, os CNTs são formados por arranjos hexagonais de carbono dispostos em folhas de GR, com carbonos em hibridização  $sp^2$ , apresentando um formato cilíndrico (IJIMA, 2002). Como pode ser visto na **Figura 11**, estes materiais podem ser constituídos por uma única folha de GR, referido como CNTs de parede

simples (SWCNTs, do inglês “*Single-Walled Carbon Nanotubes*”), ou múltiplas camadas concêntricas de GR, formando estruturas conhecidas como CNTs de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês “*Multi-Walled Carbon Nanotubes*”). Os SWCNTs apresentam 0,75 a 3 nm de diâmetro e cerca de 50  $\mu\text{m}$  de comprimento. Enquanto os MWCNTs exibem um diâmetro médio de 2 a 100 nm, com uma distância entre as camadas concêntricas de GR de 0,42 nm (YANG et al., 2015). O ângulo de enrolamento das folhas de GR define se os CNTs são condutores (metálicos) ou semicondutores. Os nanotubos do tipo “armchair” possuem comportamento metálico e nanotubos dos tipos “chiral” e “zig-zag” podem ser metálicos ou semicondutores, dependendo do vetor quiral. Em geral, os MWCNTs têm sido mais utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos do que os SWCNTs, isto pode ser atribuído ao alto custo de obtenção dos SWCNTs e sua difícil manipulação (GAO et al., 2012).

**Figura 11.** (a) Representação esquemática dos vetores na rede em uma folha de GR para produção dos diferentes tipos de CNTs (“armchair”, “zig-zag” e “chiral”) e (b) estrutura dos MWCNTs.



FONTE: GAO et al., 2012.

O GR é considerado o elemento estrutural básico dos CNTs, constituído por uma camada planar de átomos de carbono ligados em  $sp^2$  numa estrutura hexagonal. O GR possui propriedades eletrônicas que o situam entre os metais e os semicondutores, sendo considerado um semicondutor de “gap” próximo de zero, ou seja, a movimentação dos elétrons ocorre livremente entre a banda de valência e a banda de condução sem passar por nenhum “gap” de energia. O GR apresenta uma resistividade baixa em temperatura ambiente ( $10^{-8} \Omega/\text{m}$ ), sendo

este um valor menor do que o encontrado para a Ag, considerado o material com menor resistividade, e alta condutividade elétrica ( $>6.000 \text{ S/cm}$ ). Estas propriedades quando aplicadas ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos facilitam a condução de elétrons entre as biomoléculas e a superfície do GR, consequentemente contribuindo para a sensibilidade da plataforma sensora. O GR apresenta uma elevada área superficial, com limite teórico de  $2630 \text{ m}^2/\text{g}$  para uma única folha de GR, representando o dobro do valor quando comparado aos SWCNTs. Esta característica possibilita um aumento da área reativa para imobilização de biomoléculas (GAO & DUAN, 2015; VASHIST & LUONG, 2015).

A fonte mais abundante de baixo custo para obtenção de GR é o grafite natural, pois este consiste em várias folhas de GR empacotadas, unidas por forças de van der Waals com distâncias interplanares de  $0,34 \text{ nm}$ . O primeiro isolamento de uma única folha de GR, descrito por NOVOSELOV et al. (2004), foi obtido através da esfoliação mecânica do grafite. Outros métodos, descritos posteriormente para obtenção do GR com maior rendimento, empregam o princípio da esfoliação química, no qual o grafite é submetido a tratamentos químicos com ácidos fortes ou com outros compostos oxidantes. Este tipo de síntese é também utilizado para obtenção do GR oxidado, caracterizado pela presença de grupos funcionais ligados ao carbono agora em hibridização  $\text{sp}^3$ , tais como grupos hidróxidos ( $-\text{OH}$ ), epóxi ( $-\text{O}-$ ) e carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ). O GR oxidado possui propriedades condutoras menos atrativas, assim há a necessidade de retirar os grupos funcionais e reestabelecer à rede de carbono  $\text{sp}^2$ , através do processo de redução do GR oxidado (GAO & DUAN, 2015).

## **2.4 Caracterização de superfícies sensoras**

### **2.4.1 Técnicas eletroquímicas**

As técnicas eletroquímicas encontram aplicações em diversos campos desde a pesquisa básica até a análise de rotina, possibilitando o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e algumas propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência e carga elétrica. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroquímicas são adequadas para quantificação de espécies de interesse em diferentes áreas de estudo (SOUZA, MACHADO & AVANCA, 2003).

Em geral, as diferentes técnicas eletroquímicas utilizam um sistema constituído por três eletrodos para aquisição dos dados, sendo composto por: um eletrodo de trabalho, um

eletrodo de referência (prata/cloreto de prata - Ag/AgCl ou calomelano saturado - Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hg) e um eletrodo auxiliar (fio de platina). Estes eletrodos são conectados a um potenciostato e imersos em uma célula contendo a solução da espécie eletroativa com um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte), responsável por garantir o controle difusional das espécies. As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (GRIESHABER et al., 2008; PACHECO et al., 2013).

Dentre as técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica (CV, do inglês “*Cyclic Voltammetry*”) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”) são as mais indicadas para caracterização das plataformas de biossensoriamento, por permitirem acompanhar as etapas de modificação da superfície eletródica em função dos parâmetros elétricos (densidade de corrente, capacitância, resistência, entre outros).

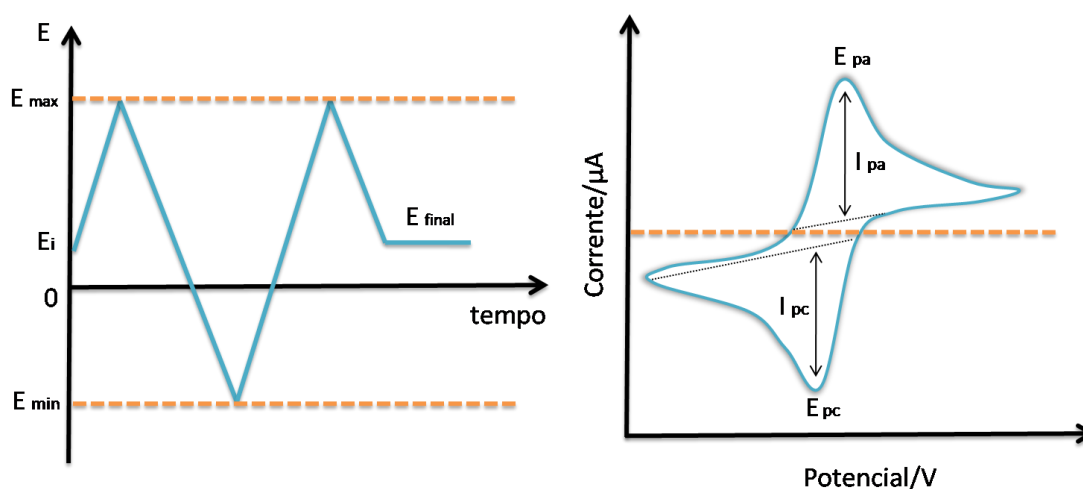
#### 2.4.1.1 Voltametria cíclica

A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroanalíticas nas quais as informações sobre o analito são mensuradas através da análise das variações de corrente resultantes de reações de oxidação e redução após aplicação controlada de uma diferença de potencial. Neste processo, uma corrente capacitiva é gerada, correspondendo às alterações na dupla camada do eletrodo após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes farádicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox na superfície sensora. Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na superfície do eletrodo é proporcional à corrente (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2001; LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

Embora seja pouco utilizada em análises quantitativas, à técnica de CV é muito empregada para obtenção de informações sobre os processos eletroquímicos, como reações redox, detecção de intermediários de reações, observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos, etc. Geralmente, é a primeira técnica selecionada na investigação de um sistema que contém espécies eletroativas, uma vez que indica o potencial redox destas espécies (HARRIS, 2005; SKOOG et al., 2008).

A resposta em corrente neste método é obtida quando se submete o eletrodo de trabalho a uma onda triangular de potencial controlado, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada em função do potencial aplicado. Obtém-se como resposta a essa perturbação, um par de picos catódico e anódico registrados em uma curva voltamétrica, denominada voltamograma cíclico, no qual se relaciona a variação da corrente (eixo y) vs. a variação de potencial (eixo x) (**Figura 12**). Os principais parâmetros analisados em um voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico ( $E_{pc}$ ) e anódico ( $E_{pa}$ ), e as correntes de pico catódico ( $I_{pc}$ ) e anódico ( $I_{pa}$ ). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons (BARD & FAULKNER, 2001; HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

**Figura 12.** Representação gráfica da técnica de CV: **(a)** variação linear do potencial vs. tempo e **(b)** voltamograma cíclico indicando os principais parâmetros a serem analisados:  $I_{pa}$ ,  $I_{pc}$ ,  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ .



Adaptado de: BREET & BREET, 1993.

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface sensora, as correntes de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Neste sistema, os produtos gerados podem ser novamente oxidados ou reduzidos na superfície do eletrodo, resultando picos catódicos e anódicos em potenciais simétricos. Outros critérios adotados para determinação de um sistema reversível são: a razão entre as correntes de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  aproximadamente iguais e a não variação dos potenciais de pico ( $E_{pa}$  ou  $E_{pc}$ ) em relação à velocidade de varredura (YUAN et al., 2010).

A primeira análise teórica de um sistema reversível foi descrita por RANDLES (1948), na qual é possível obter a corrente de pico ( $I_p$ ) como indicado na seguinte equação:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0$$

onde  $n$  é o número de elétrons envolvidos no processo,  $A$  é a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D_0$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C_0$  é a concentração da espécie em solução ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

#### 2.4.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

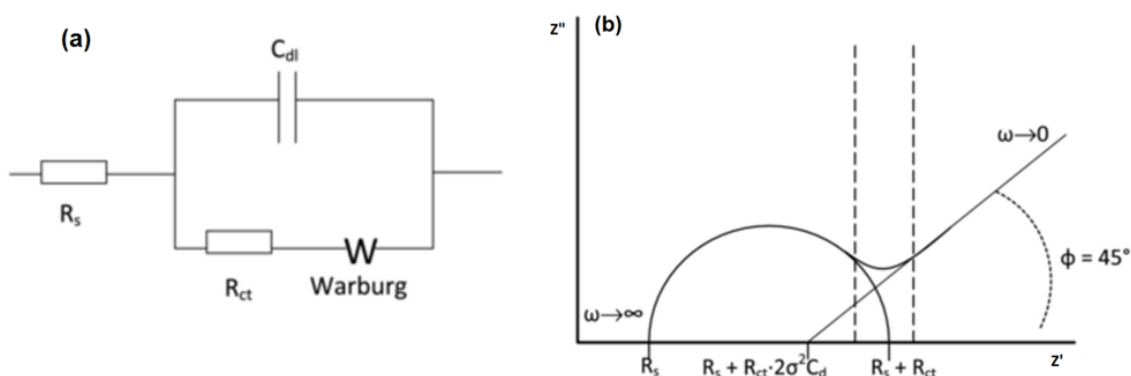
A EIS tem como princípio a aplicação de uma pequena perturbação de potencial senoidal a uma determinada frequência e registro da correspondente variação de corrente (DAMOS, MENDES & KUBOTA, 2004; PRODRONIDIS, 2010). Este método possibilita que o sistema seja perturbado com o emprego de pequenos valores de potencial, tornando possível a investigação de fenômenos próximos ao estado de equilíbrio. Uma vez que a onda de potencial é senoidal, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência (tipicamente na faixa de 10  $\mu\text{Hz}$  – 10 GHz) obtendo-se uma corrente alternada (AC) de natureza senoidal. Mediante o monitoramento da relação entre o potencial aplicado e a corrente resultante, pode ser medido a impedância do sistema e o ângulo de fase, sendo este último definido como a defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado (BARD & FAULKNER, 2001; DAMOS, MENDES & KUBOTA, 2004). A partir desses dois parâmetros é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, entre outros (JIANG & KUCERNAK, 2002).

A caracterização de um sistema eletroquímico através da EIS pressupõe, portanto, a interpretação dos resultados por meios de modelos adequados. O modelo descrito por um circuito equivalente é ajustado aos resultados experimentais para prever o comportamento do sistema em várias condições. O circuito elétrico equivalente de Randles é o mais empregado para modelagem dos dados de EIS, sendo composto basicamente por: uma resistência da solução ( $R_s$ ), um capacitor da dupla camada eletrodo/solução ( $C_{dl}$ ), uma resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) e a impedância de Warburg ( $W$ ) (**Figura 13a**) (KATZ, ALFONTA & WILLNER, 2001; PRODRONIDIS, 2010).

A impedância de um sistema é usualmente expressa como números complexos, no qual a resistência é a componente real e a capacitância a componente imaginária. A forma

mais comum de representação dos resultados da técnica de impedância é o diagrama em plano complexo, também conhecido como diagrama de Nyquist (**Figura 13b**). Nesta representação, a componente imaginária ( $Z''$ ) é plotada em relação à sua correspondente componente real ( $Z'$ ). Em regiões de altas frequências a componente real da impedância fornece informações sobre a  $R_s$  e em regiões de baixa frequência sobre  $R_s + R_{ct}$ . Assim, avaliando o comportamento dielétrico em função da frequência, é possível obter informações sobre a  $R_s$  na região de altas frequências e na região de baixas frequências sobre o processo de  $R_{ct}$  que ocorre no eletrodo (DAMOS, MENDES & KUBOTA, 2004; PRODROMIDIS, 2010).

**Figura 13.** (a) Principais componentes do circuito equivalente de Randles, onde  $R_{CT}$  corresponde à resistência à transferência de carga  $C_{dl}$ , à capacitância da dupla camada elétrica,  $R_s$ , à resistência da solução, e  $W$ , à impedância de Warburg; e (b) diagrama de Nyquist, indicando as componentes real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) da impedância em função da variação da frequência ( $\omega$ ).



FONTE: PRODROMIDIS, 2010.

## 2.5 Caracterização estrutural e topográfica

As técnicas de caracterização estrutural e topográfica tem sido de grande importância em estudos de superfície de SPEs, sendo utilizadas por alguns autores na tentativa de encontrar relações entre a morfologia superficial dos eletrodos e seu desempenho eletroquímico (MARTÍNEZ-PAREDES, GONZÁLEZ-GARCÍA & COSTA-GARCÍA, 2009). Neste trabalho, análises por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR, do inglês “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”), microscopia de força atômica (AFM, do inglês “*Atomic Force Microscopy*”) e microscopia de eletrônica de varredura (SEM, do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”) foram empregadas para caracterização das plataformas sensoras desenvolvidas.

### 2.5.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

FT-IR é uma técnica óptica que tem como princípio a detecção da radiação absorvida pelas ligações moleculares de diferentes materiais. A luz infravermelha, ao incidir sobre uma molécula, provoca a excitação dos seus grupos químicos em modos vibracionais. Assim, quando a energia radiante corresponde ao mesmo nível energético vibracional da molécula em análise, a luz é absorvida (GRIFFITHS & HASETH, 2007; ALBERT, ALBERT & QUACK, 2011).

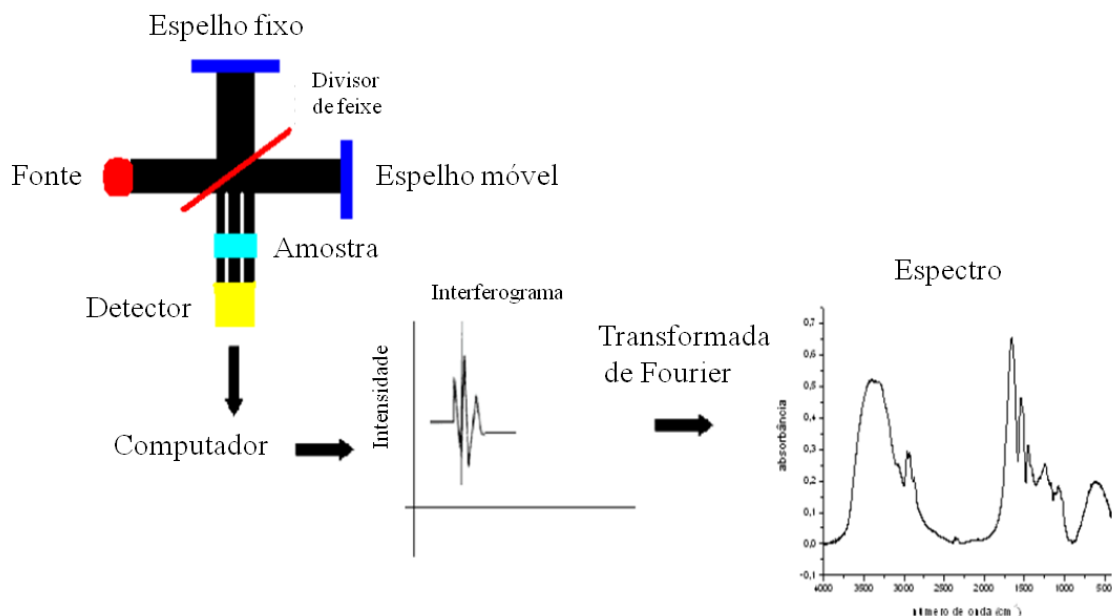
A radiação infravermelha está localizada no espectro eletromagnético entre a luz visível e as micro-ondas, compreendendo um espectro extenso entre 14000 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Esta região pode ser dividida em três sub-regiões: infravermelho próximo ( $14000$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), infravermelho médio ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) e infravermelho distante ( $400$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ ). A porção de maior utilidade para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas está situada entre  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , o infravermelho médio (SILVERSTEIN, BASSLER & MORRILL, 2000).

O espectro de infravermelho é obtido através da representação gráfica da intensidade de radiação, absorvida ou transmitida pela molécula, vs. o número de onda, que é proporcional à diferença de energia entre o estado fundamental e os estados excitados de vibração (LARKIN, 2011). Cada molécula possui um espectro de absorção único, como uma impressão digital. A partir do conhecimento da localização das vibrações de absorção de cada grupo funcional da molécula investigada é possível caracterizar as amostras. A área mais importante para o exame preliminar dos espectros é a região de  $1300$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , a chamada região dos grupos funcionais. Nessa região, ocorrem as absorções que correspondem a grupos funcionais importantes, como  $\text{-OH}$ ,  $\text{-NH}$  e  $\text{-C=O}$  (SMITH, 1998; STUART, 2005).

O espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier é constituído por uma fonte de luz na região do infravermelho, um interferômetro com um espelho móvel e um fixo, um detector, um conversor analógico/digital e um computador (**Figura 14**). O interferômetro permite dividir um feixe de radiação da fonte em dois e, então, recombinar os mesmos de forma que as variações de intensidade do feixe de saída podem ser medidas por um detector como função da diferença de trajeto entre os dois feixes. A técnica utiliza dois espelhos planos perpendiculares, sendo um fixo, e outro movido à velocidade constante. Entre os dois espelhos há um divisor de feixe, onde a radiação da fonte externa pode ser parcialmente refletida no espelho fixo e parcialmente transmitida ao espelho móvel. Os feixes então retornam ao divisor de feixe, passam pela amostra e finalmente chegam ao detector. O sinal produzido é um interferograma, que é a variação da amplitude da luz absorvida ou transmitida

em função da varredura do espelho móvel (FORATO et al., 2010). O espectro detectado não pode ser diretamente interpretado, necessitando ser reconstruído por aplicação da transformada de Fourier. Os dados tratados representam a relação da absorbância (ou transmitância) da ligação dos grupos químicos vs. a frequência ou número de onda (GRIFFITHS & HASETH, 2007).

**Figura 14.** Esquema do princípio de um espectrômetro de FTIR na geração de um espectro.



FONTE: FORATO et al., 2010.

A espectroscopia de Reflectância Total Atenuada (ATR, do inglês “*Attenuated Total Reflectance*”) é a técnica de espectroscopia no infravermelho mais simples de ser utilizada, tendo em vista que possibilita análises a partir de pequenas quantidades de amostras, sem que seja necessário nenhum tipo de preparação prévia das mesmas. O método de ATR baseia-se na medição da perturbação causada pela reflexão interna total na amostra quando um feixe de radiação infravermelha passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra). Essa reflectância interna cria uma onda evanescente que se estende para além da superfície do cristal no interior da amostra, mantida em contato com o cristal. Em regiões do espectro de infravermelho onde a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada ou alterada. A energia atenuada de cada onda evanescente é mensurada pelo detector do espectrômetro, gerando um espectro de infravermelho (LARKIN, 2011; PERKINELMER, 2015).

### 2.5.2 Microcopia eletrônica de força atômica

As análises por AFM permitem obter imagens em duas e três dimensões representativas da topografia da superfície estudada, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas. Os componentes essenciais de um AFM são uma cerâmica piezelétrica (scanner), um cantilever acoplado a uma ponteira na sua extremidade, um fotodetector, um sistema de realimentação e um computador, que armazena e processa as diferentes deflexões da sonda (FERREIRA & YAMANAKA, 2006).

O sistema do AFM opera sobre o controle de moduladores piezelétricos que permitem a movimentação vertical e horizontal da ponteira à medida que a mesma se aproxima da superfície da amostra, causando uma deflexão do cantiliver. Esta deflexão é mensurada através da mudança de direção (angular) de um feixe de laser colimado, emitido e refletido sobre a superfície superior do cantiliver. As variações de posição e de intensidade da luz do feixe laser refletido são então captadas por um fotodetector. Durante o deslocamento da ponta pela superfície o computador analisa, em cada posição, a força de interação entre a ponta e a amostra e traça um diagrama de alturas, reconstruindo a topografia da amostra. Assim, a técnica de AFM dispensa a etapa de preparação da amostra com recobrimento por materiais condutores, permitindo a análise da mesma sem perda das suas propriedades (MORITA, WIESENDANGER & MEYER, 2002; PAQUIM & BRET, 2009).

A distância entre a ponteira e a amostra é de fundamental importância para a caracterização do material, para a resolução das imagens e qualidade dos resultados. As forças de interação entre a ponteira e a amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância entre ambos. À medida que a ponteira se aproxima da amostra, forças atrativas passam a atuar, tipicamente forças de van der Waals. Com o aumento do nível de aproximação chegando ao contato direto, forças eletrostáticas repulsivas entre a ponteira e a amostra prevalecem. Nesse aspecto, três modos de operação são definidos de acordo com a distância existente entre a ponteira e a amostra: *contato*, no qual interações repulsivas são predominantes, permitindo a obtenção de imagens com alta resolução, entretanto, pode danificar a amostra; *não-contato*, na qual interações atrativas são predominantes, apresentando a vantagem de não danificar a amostra, porém a resolução normalmente fica limitada a algumas dezenas de nanômetros, devido à distância da ponteira em relação à amostra; e *contato intermitente*, no qual a ponteira oscila sobre a superfície da amostra, tocando-a periodicamente, reunindo as vantagens dos dois modos anteriores (PAQUIM & BRET, 2009).

### 2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A SEM é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para observação e análise das características microestruturais e nanoestruturais de materiais sólidos. O princípio da SEM consiste em utilizar um feixe de elétrons para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado varrendo a superfície da amostra, de modo que o sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. A interação entre o feixe e a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores e convertidos em um sinal de vídeo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Os sinais de maior interesse para a formação das imagens são os elétrons secundários e os retroespalhados. Os elétrons secundários, elétrons de baixa energia, são gerados pelas interações elétron-átomo da amostra, por isso, somente aqueles gerados junto à superfície podem ser reemitidos e, mesmo estes, são muito vulneráveis à absorção pela topografia da superfície. Já os elétrons retroespalhados, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra, contribuindo para observar qualitativamente a composição da amostra (DEDAVID, GOMES & MACHADO, 2007).

### 2.6 Bioensaios eletroquímicos livres de marcador

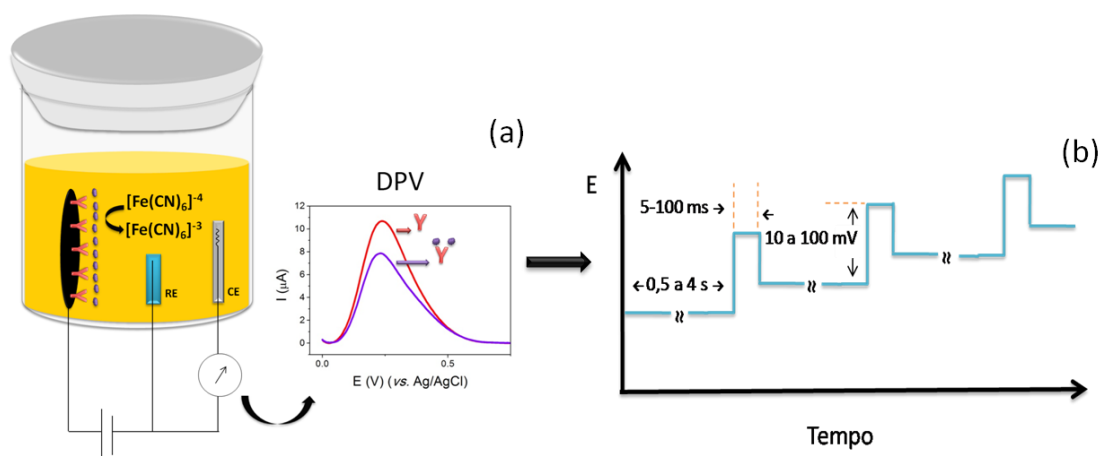
O princípio dos bioensaios eletroquímicos livres de marcador baseia-se no monitoramento de correntes farádicas sobre a interface da superfície sensora. Neste sistema, alterações provocadas pelo rearranjo de cargas na superfície sensora promovem a formação de uma dupla camada na interface sensora, que influencia todos os processos de transferência de carga e podem ser correlacionadas com as reações de biorreconhecimento. Medidas de capacitância, impedância, condutância e potencial são as mais utilizadas para o monitoramento das mudanças no padrão de cargas na região de dupla camada sensor/eletrólito utilizando-se um par redox como sonda da reação (PIAO et al., 2008).

Recentemente, a detecção livre de marcador em biossensores de afinidade, através da medição de corrente em técnicas eletroquímicas controladas por pulsos de potenciais, tem possibilitado a construção de sistemas mais simplificados quando comparado aos sensores impedimétricos e capacitivos (ALTINTAS, FAKANYA & TOTHILL, 2014). Nesta Tese, a

voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês “*Differential Pulse Voltammetry*”) foi utilizada como técnica analítica para detecção das interações de bioafinidade antígeno-anticorpo e MIP-proteína.

Na DPV, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre o eletrodo de trabalho durante a variação contínua de potencial em intervalos de tempo pré-estabelecidos (**Figura 15**). As respostas em corrente são medidas em dois pontos a cada pulso, o primeiro ponto antes da aplicação do pulso e o segundo ao final do pulso. A diferença de corrente entre os dois pontos é relacionada graficamente com o potencial aplicado, gerando um voltamograma de picos de corrente com a forma de uma curva gaussiana, cuja altura é proporcional à concentração do analito (BARD & FAULKNER, 2001; BUFFLE & TEECIER-WAEBER, 2005).

**Figura 15.** (a) Esquema ilustrativo de um sistema eletroquímico de detecção livre de marcador empregando a técnica de DPV e (b) gráfico representativo dos sinais de excitação em pulsos de potencial vs. tempo para obtenção dos voltamogramas de pulso diferencial.



FONTE: Elaborada pelo autor.

## 2.7 Imunossensores e sensores biomiméticos para detecção da cTnT

Um dos grandes desafios para os imunossensores e sensores biomiméticos dirigidos à detecção da cTnT em soro e sangue humano está em alcançar um baixo limite de discriminação (“*cutoff*”) requerido para o diagnóstico diferencial do AMI. Segundo a IV diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia (NICOLAU et al., 2014), os níveis séricos de cTnT encontram-se acentuadamente elevados em concentrações acima de 0,01 ng/mL.

Estima-se que o valor limite normal da cTnT seja também próximo para o sangue total, porém até o momento ainda não se tem estabelecidos os níveis deste marcador para este fluido.

Atualmente, propostas de imunossensores para detecção da cTnT têm sido registrados na literatura envolvendo diferentes métodos de transdução. Dentre estes, estão reportados os imunossensores marcados (eletroquímicos amperométricos) e os não marcados (ópticos, piezelétricos, capacitivos, impedimétricos, amperométricos) (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Imunossensores para detecção da cTnT descritos na literatura nos últimos 10 anos.

|                                      | <b>Transdutor</b>                                  | <b>Faixa linear de<br/>detecção</b> | <b>Limite de<br/>detecção</b> |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <b>DUTRA et al. (2007)</b>           | Óptico, SPR                                        | 0,05 – 4,5 ng/mL                    | 0,05 ng/mL                    |
| <b>DUTRA &amp; KUBOTA<br/>(2007)</b> | Óptico, SPR                                        | 0,03 - 6,5 ng/mL                    | 0,01 ng/mL                    |
| <b>WONG-Ek et al. (2010)</b>         | Piezelétrico, QCM                                  | 0,001 – 0,1 mg/mL                   | -                             |
| <b>MATTOS et al. (2012)</b>          | Piezelétrico, QCM                                  | 0,025- 4 ng/mL                      | 0,008 ng/mL                   |
| <b>CHUA et al. (2009)</b>            | Capacitivo                                         | 1 ng/mL – 1 fg/mL                   | 1 fg/mL                       |
| <b>VASCONCELOS et al.<br/>(2009)</b> | Capacitivo                                         | 0,01 – 5 ng/mL                      | -                             |
| <b>SILVA et al. (2010)</b>           | Eletroquímico amperométrico<br>(marcado)           | 0,1 -10 ng/mL                       | 0,2 ng/mL                     |
| <b>GOMES-FILHO et al.<br/>(2013)</b> | Eletroquímico amperométrico<br>(marcado)           | 0,1 -10 ng/mL                       | 0,033 ng/mL                   |
| <b>JACOBS et al. (2014)</b>          | Eletroquímico impedimétrico                        | 0,0001-100 pg/mL                    | 0,1 pg/mL                     |
| <b>ZAPP et al. (2014)</b>            | Eletroquímico amperométrico<br>(livre de marcação) | 0,1 – 0,9 ng/mL                     | 0,0076 ng/mL                  |

Os trabalhos pioneiros para quantificação da cTnT foram realizados por DUTRA & KUBOTA (2007) e DUTRA et al. (2007) na determinação do analito em soro humano empregando transdutores ópticos utilizando o princípio dos sistemas SPR. Monocamadas auto-organizadas (SAMs, do inglês “*Self-assembled monolayers*”) foram utilizadas como suporte de imobilização dos anticorpos anti-cTnT. Estes estudos abriram perspectivas para investigação de outras configurações de SAMs de tióis em transdutores piezelétricos (WONG-Ek et al., 2010; MATTOS et al., 2012), e posteriormente, em sensores capacitivos mais simplificados e miniaturizados. Nestes últimos dispositivos, os anticorpos anti-cTnT foram imobilizados sobre superfícies silanizadas (CHUA et al., 2009) ou modificadas com alcanos de tióis em sensores interdigitados (VASCONCELOS et al., 2009).

Diversos imunossensores eletroquímicos foram propostos para a detecção da cTnT. Destaca-se o imunossensor marcado, desenvolvido por SILVA et al. (2010) utilizando SPes obtidos de compósitos formados por epóxi-prata/grafite como suporte sensor para imobilização de anticorpos anti-cTnT bioconjugados à micropartículas de látex. Foi proposto um imunoensaio tipo sanduíche, sendo a detecção da cTnT realizada pela atividade enzimática da peroxidase conjugada à anticorpos anti-cTnT. Apesar do aumento da área eletródica, e consequentemente de anticorpos imobilizados, o imunossensor apresentou limitações quanto à sensibilidade analítica. A introdução de nanomateriais de carbono nos imunossensores eletroquímicos trouxe novos avanços superando limites de detecção. GOMES-FILHO et al. (2013) introduziram a combinação de nanotubos de carbono e polímeros para detecção da cTnT em solução, conseguindo a detecção da cTnT na ordem de poucos picogramas. Dentre os imunossensores não marcados, destacam-se as propostas de sistemas impedimétricos, cujo limite de detecção foi alcançado com o emprego de nanopartículas metálicas formando bioconjugados com anticorpos anti-cTnT (JACOBS et al., 2014; ZAPP et al., 2014). Embora não utilizem anticorpos secundários conjugados a marcadores, fornecendo resultados mais rápidos do que os imunossensores amperométricos baseados em reações enzimáticas, uma das grandes limitações dos sistemas impedimétricos é atribuída ao baixo índice da relação sinal-ruído e das capacitâncias indesejáveis que limitam esta abordagem para aplicações em testes à beira do leito. Desta forma, embora tenham-se descritos diversos imunossensores na literatura, ainda precisam ser superados novos desafios para alcançar os limites de detecção desejados, reprodutibilidade e custo compatível para aplicação como testes à beira do leito e de mono uso.

Numa outra perspectiva de abordagem dos dispositivos analíticos para detecção da cTnT, destacam-se os sensores biomiméticos. Pioneiramente, o primeiro sistema biomimético para a cTnT foi descrito por MOREIRA et al. (2011). Neste trabalho, a cTnT foi mimetizada utilizando uma matriz polimérica de acrilamida e bisacrilamida, diretamente sobre a superfície de CNTs. Apesar do sucesso em obtenção dos sítios de reconhecimento, observam-se limitações quando ao rendimento final e exposição das cavidades biomiméticas, influenciando assim a sensibilidade do sensor. Mais recentemente, KARIMIAN et al. (2014) descreveram a utilização de polímeros funcionais como matriz polimérica para biomimetização da cTnT sobre a superfície de eletrodos de ouro. As cavidades formadas apresentaram uma boa sensibilidade para detecção da cTnT em níveis clínicos, entretanto, a plataforma ainda não se ajusta as tecnologias de sensores para testes rápidos. Assim, tendo em vista a importância de uma plataforma sensora que se adeque a todas as necessidades para um

diagnóstico rápido, preciso, miniaturizado e de baixo custo para detecção da cTnT, ainda é necessário à continuação das pesquisas na área.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver sensores impressos nanoestruturados para detecção eletroquímica livre de marcador da troponina T cardíaca humana.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver plataformas sensoras empregando eletrodos impressos modificados com nanotubos de carbono e grafeno, visando à aplicação em ensaios eletroquímicos;
- Imobilizar anticorpos anti-troponina T nas plataformas sensoras;
- Biomimetizar a troponina T empregando polímeros orgânicos condutores;
- Caracterizar a estrutura e topografia das plataformas sensoras utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura e força atômica;
- Otimizar os parâmetros experimentais para determinação da troponina, tais como, concentração do eletrólito, concentração de anticorpo, tempo de imunoreação, números de ciclos de polimerização e tempo de extração;
- Estabelecer curvas analíticas dos sensores para determinação da troponina em amostra padrão e de soro de pacientes infartados, empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

## 4. MANUSCRITOS

### 4.1 Manuscrito I

Manuscrito publicado no periódico *Talanta*





# A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T



Bárbara V.M. Silva, Igor T. Cavalcanti, Mízia M.S. Silva, Rosa F. Dutra\*

Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 March 2013

Received in revised form

28 August 2013

Accepted 30 August 2013

Available online 6 September 2013

### Keywords:

Immunosensor

Screen-printed electrode

Carbon nanotube

Human cardiac troponin T

Point-of-care testing

## ABSTRACT

Label-free immunosensor based on amine-functionalized carbon nanotubes screen-printed electrode is described for detection of the cardiac troponin T, an important marker of acute myocardial infarction. The disposable sensor was fabricated by tightly squeezing an adhesive carbon ink containing carbon nanotubes onto a polyethylene terephthalate substrate forming a thin film. The use of carbon nanotubes increased the reproducibility and stability of the sensor, and the amine groups permitted nonrandom immobilization of antibodies against cardiac troponin T. Amperometric responses were obtained by differential pulse voltammetry in presence of a ferrocyanide/ferricyanide redox probe after troponin T incubation. The calibration curve indicated a linear response of troponin T between  $0.0025 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ , with a good correlation coefficient ( $r=0.995$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n=7$ ). The limit of detection ( $0.0035 \text{ ng mL}^{-1}$  cardiac troponin T) was lower than any previously described by immunosensors and was comparable with conventional analytical methods. The high reproducibility and clinical range obtained using this immunosensor support its utility as a potential tool for point-of-care acute myocardial infarction diagnostic testing.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human cardiac troponin T (cTnT) is a sensitive and specific marker of cardiac injury that is regarded as the gold standard marker in the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). The detection of ultra-low levels of cTnT during early stages of cardiac disease facilitates the risk stratification and prognosis of the heart damage. The blood cTnT concentration rises rapidly within 3–4 h after AMI onset [1–3] and can be analyzed in the laboratory using several well-established enzymatic immunoassays based on reactions with chromogenic [4] and chemiluminescent substrates [5]. Point-of-care testing for cTnT could provide a potential analytical tool to reduce the turnaround time for assay compared with currently methods. Immunosensor technology offers a practical and simple immunoassay method for the determination of cTnT in the emergency departments.

Although immunosensors based on optic [6–9] and piezoelectric [10–12] transductions have been widely described for label-free cTnT detection, they are not suitable for point-of-care testing because they require more complex instrumentations and laborious manufacturing procedures, besides they are more expensive and difficult to miniaturize. Electrochemical transducers

employing screen-printed electrodes (SPEs) have emerged as appropriate for point-of-care testing. These transducers are easily adaptable for in mass production, disposable and interchangeable with other biosensors, such as popular enzymatic glucometers [13,14]. Another advantage exhibited by the SPEs is their versatility to obtain electrodes with modifications in size and thickness by simple changing squeezing pressure, resulting in electrodes more sensitive and exhibiting improved electrochemical proprieties.

The cTnT detection in human serum by using electrochemical immunosensors has been possible by some authors [15–18]. However, the requirement of the electroactive species like the peroxidase enzyme that are dependent on Michaelis–Menten kinetic limits the immunosensor sensitivity. Moreover, the necessity for additional biochemical steps, including conjugated antibody incubations and reactions with specific substrates, increases the analysis time [19]. Recently reports have described label-free immunosensors that use voltammetric techniques, such as differential pulse voltammetry (DPV) [20,21]. This technique measures current by generating successive and regular voltage pulses superimposed on the potential linear sweep or stair steps. The current in an immunosensor is changed by antigen–antibody coupling on the electrode surface altering the mass transfer (i.e., electronic diffusion). At high potentials, DPV is limited by the high background current that hinders mass transfer and leads to a reduction in the accuracy of the amperometric response [22]. In attempting to overcome these difficulties some nanomaterials have been

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 81 2126 8000.

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

proposed increasing the accuracy of immunosensors. Carbon nanotubes (CNTs) have attracted considerable attention due to their extraordinary properties, including their ability to mediate the electron-transfer reactions and to increase electrode surface area [23]. Gomes-Filho et al. [17] have proposed CNTs as alternative suggestion for the detection of serum cTnT with low limit of detection (LOD), although the conjugation of peroxidase to anti-cTnT was necessary to obtain the amperometric signal.

CNTs have been commonly deposited onto an electrode surface by simple adsorption [24] or assembled on a polymeric film [17]. However, these strategies are associated with instabilities in the response because the CNTs can leach during the measurement process. When the CNTs are incorporated into the sensor matrix (i.e., by forming nanocomposites), it is easier to control the amount of the CNTs used and to minimize their loss. Additionally, this procedure has advantage to be a one-step preparation method [25] and to dispense the use of electron-transfer mediators [26], beside CNTs act as anchors for an optimal biomolecules immobilization. Due to their facility to be functionalized with amine groups antibodies should be immobilized by Fc portion in order to expose the Fab sites to the epitopes [27]. In this study, amine functionalized CNTs were incorporated into the ink printing used to fabricate SPEs (CNT-SPE). A stable and oriented immobilization of antibodies combined with the electrochemical advantages of the CNTs allowed a rapid detection of cTnT. No labels were necessary when the antigen–antibody interactions were measured by applying DPV. The method described herein involves a straightforward preparation process and represents an advancement in the adaptation of SPEs point-of-care testing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and patient samples

Native cTnT purified from human cardiac muscle tissue was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Mouse monoclonal anti-cTnT was purchased from Abcam (Cambridge, England). Amine-functionalized, multi-walled, 95% pure CNTs ( $\text{NH}_2$ -CNTs), were obtained from DropSens (Oviedo, Spain). Potassium ferricyanide ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), potassium ferrocyanide ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), dimethylformamide (DMF), and glycine were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Carbon ink (Electrodag PF-407C) was purchased from Acheson (Port Huron, MI, USA) for the fabrication of the CNT-SPEs. Phosphate-buffered saline (PBS) ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4) used in all experiments was prepared by dissolving 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 1000 mL of deionized Milli-Q water (from Millipore, units (Bedford, MA, USA). All chemicals were analytical grade.

Blood serum samples were collected from patients with AMI who were admitted to the Cardiac Emergency Hospital of Pernambuco—PROCAPE (Recife, Brazil). An automatic Elecsys 2010 Immunoassay Analyzer (Roche Diagnostics) was used to quantify cTnT via an electrochemical chemiluminescence immunoassay (ECLIA). Samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  while not in use during the electrochemical measurements.

### 2.2. Apparatus

Electrochemical measurements were performed using an Ivium CompactStat potentiostat obtained from Ivium Technologies (Eindhoven, Netherlands) that was interfaced to a computer system and controlled by Ivium software. All electrochemical measurements were made using a three-electrode system comprised of the

CNT-SPE as working electrode, a helical platinum wire as auxiliary electrode, and an Ag/AgCl electrode as reference. All potentials given in this work were determined relative to the Ag/AgCl reference electrode. Electrochemical analyses were carried out using an electrochemical cell (10 mL) at room temperature (at approximately  $24^\circ\text{C}$ ).

Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy was performed to chemically characterize the CNT-SPE. FT-IR measurements were performed in attenuated total reflectance (ATR) mode using an IFS-66 FTIR (scans=50, energy scanning from  $400 \text{ cm}^{-1}$  to  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ) acquired from Bruker (Karlsruhe, Germany).

Atomic force microscopy (AFM) was performed to characterize the morphology and topography of the CNT-SPE using an alpha300S AFM obtained from WITec (Ulm, Germany). Images were acquired in tapping mode using silicon tips at  $0.2 \text{ N m}^{-1}$  constant force.

### 2.3. CNT-SPE manufacturing

The CNT-SPE was fabricated by tightly squeezing an adhesive carbon ink containing  $\text{NH}_2$ -CNTs onto a polyethylene terephthalate (PET) rectangular surface to form a thin film. Prior to carbon ink incorporation, the  $\text{NH}_2$ -CNTs (5 mg) were dispersed in 1 mL of DMF and were immersed in an ultrasonic bath for 4 h until a black homogeneous suspension was obtained. A plastic mold was affixed to the rectangular PET surface ( $0.4 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ ) to ensure SPEs with equal printed areas. After fabrication, the electrodes were cured at  $60^\circ\text{C}$  for 20 min [22]. The manufactured CNT-SPE consisted of a circular area ( $\varnothing=4 \text{ mm}$ ) joined to a rectangular area ( $1 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ ), which was used as an electrical contact. Prior to use, the CNT-SPE was cleaned rigorously by electrochemical pretreatment with 40 scans, in a potential between 2.0 V and  $-2.0 \text{ V}$  in KCl ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) [28].

### 2.4. Anti-cTnT immobilization

Prior to immobilization, the carboxylic groups of anti-cTnT antibodies ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were activated for 90 min in a solution of NHS ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and EDC ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4). Afterwards, an aliquot ( $10 \mu\text{L}$ ) of activated anti-cTnT antibodies was pipetted onto the CNT-SPE. The anti-cTnT incubation was maintained in a moist chamber at room temperature for 60 min. Finally, a glycine solution ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4) to block non-specific bindings was pipetted on the electrode for 45 min (Fig. 1a).

### 2.5. Electrochemical immunoassay

Antigen–antibody interactions at the interface of the CNT-SPE were monitored by DPV in real-time (Fig. 1b). DPV measurements were recorded from 0 V to 0.8 V with a pulse amplitude of 0.025 V, a width of 0.05 s, and a step potential of 0.05 V. The analytical response to cTnT was obtained taking into account the difference between the peak current ( $\Delta I$ ) of the CNT-SPE with cTnT and the blank (i.e. without cTnT). The current signals were registered at a fixed potential ( $+0.25 \text{ V}$ ).

Immunosensor preparation was characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) analyses. CVs were scanned from 1.0 V to  $-0.6 \text{ V}$  at  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . AC impedance measurements were performed in the frequency range from  $1 \times 10^{-2} \text{ Hz}$  to  $6.5 \times 10^4 \text{ Hz}$  in a given open circuit voltage with an amplitude of 10 mV. All electrochemical measurements were conducted in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4).

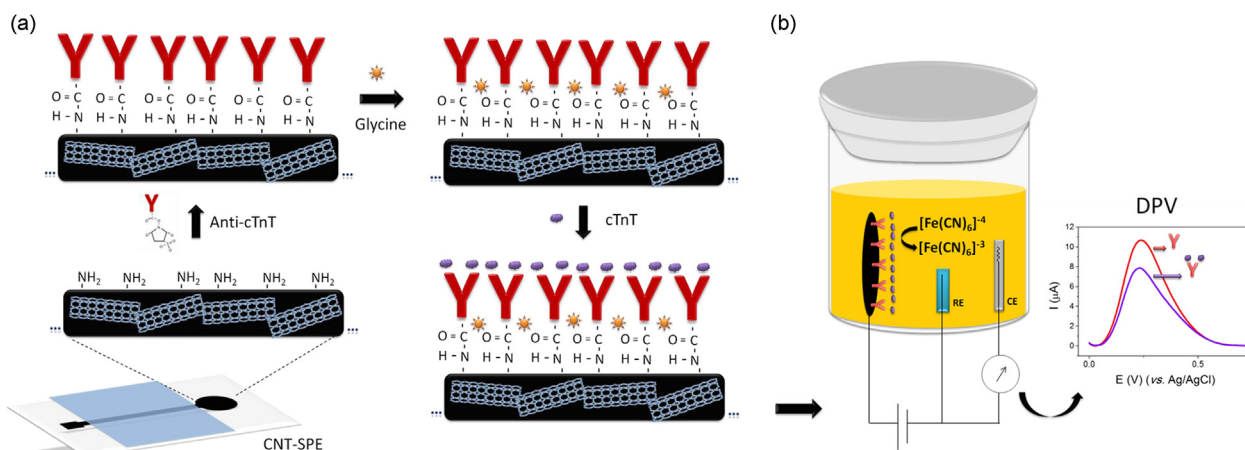


Fig. 1. Schematic representation of the (a) immunosensor fabrication and (b) electrochemical principle of detection.

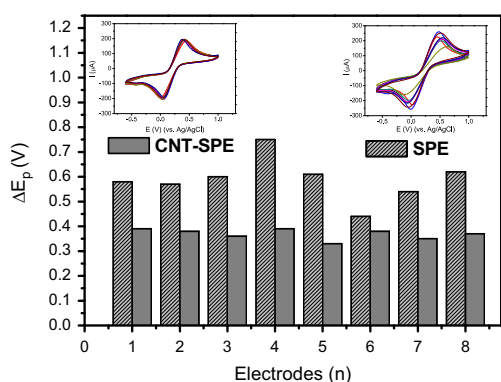


Fig. 2.  $\Delta E_p$  of the eight SPEs with and without  $\text{NH}_2$ -CNT. Inset: CVs of the electrodes with and without  $\text{NH}_2$ -CNT in presence of the  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4) at  $50 \text{ mV s}^{-1}$  scan rate.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of $\text{NH}_2$ -CNTs on the SPE

The electrochemical profile of the SPE with and without  $\text{NH}_2$ -CNTs incorporated into the carbon ink matrix was investigated initially using CVs. The influence of  $\text{NH}_2$ -CNTs on the redox peak-to-peak separation ( $\Delta E_p$ ) is shown in Fig. 2. SPEs with  $\text{NH}_2$ -CNT exhibited a lower  $\Delta E_p$  (0.38 V) than those without  $\text{NH}_2$ -CNTs (0.58 V), suggesting greater electron transfer. A lower relative standard deviation (RSD) was observed in SPEs with  $\text{NH}_2$ -CNTs (2.1%) in comparison to without  $\text{NH}_2$ -CNTs (8.7%), indicating an increased reproducibility. Additionally, a higher reversibility of the redox peaks was obtained with  $\text{NH}_2$ -CNTs, suggesting improved homogeneity and regularity of the carbon ink film on the electrode surface [29,27].

FT-IR spectra were used to investigate the modification of the carbon ink with  $\text{NH}_2$ -CNTs ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). The FT-IR spectra of the carbon ink layer without  $\text{NH}_2$ -CNTs are shown in Fig. 3a. The peak at  $3783 \text{ cm}^{-1}$  corresponds to the band of hydroxyl groups. The peaks at  $2925 \text{ cm}^{-1}$  and  $2856 \text{ cm}^{-1}$  reveal asymmetric and symmetric stretches corresponding to methyl and methylene groups, respectively. These bands are attributed to the ethylene glycol ether present in the ink [30]. The peaks at  $2385 \text{ cm}^{-1}$  and  $2301 \text{ cm}^{-1}$  are attributed to C–H stretching vibrations of alkyne groups. After incorporation of the  $\text{NH}_2$ -CNTs in the carbon ink (Fig. 3b), two peaks were observed at  $2925 \text{ cm}^{-1}$  and  $2856 \text{ cm}^{-1}$  corresponding to methyl and methylene groups, respectively [31]. It was also observed the presence of peaks corresponding to amino

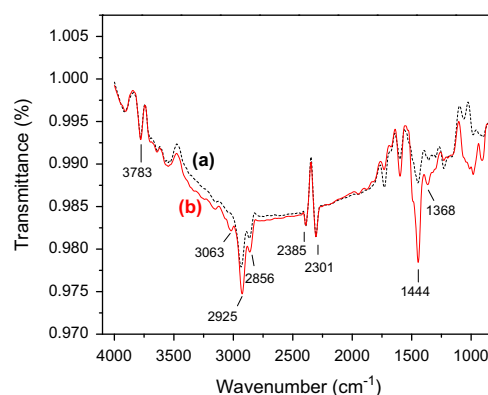


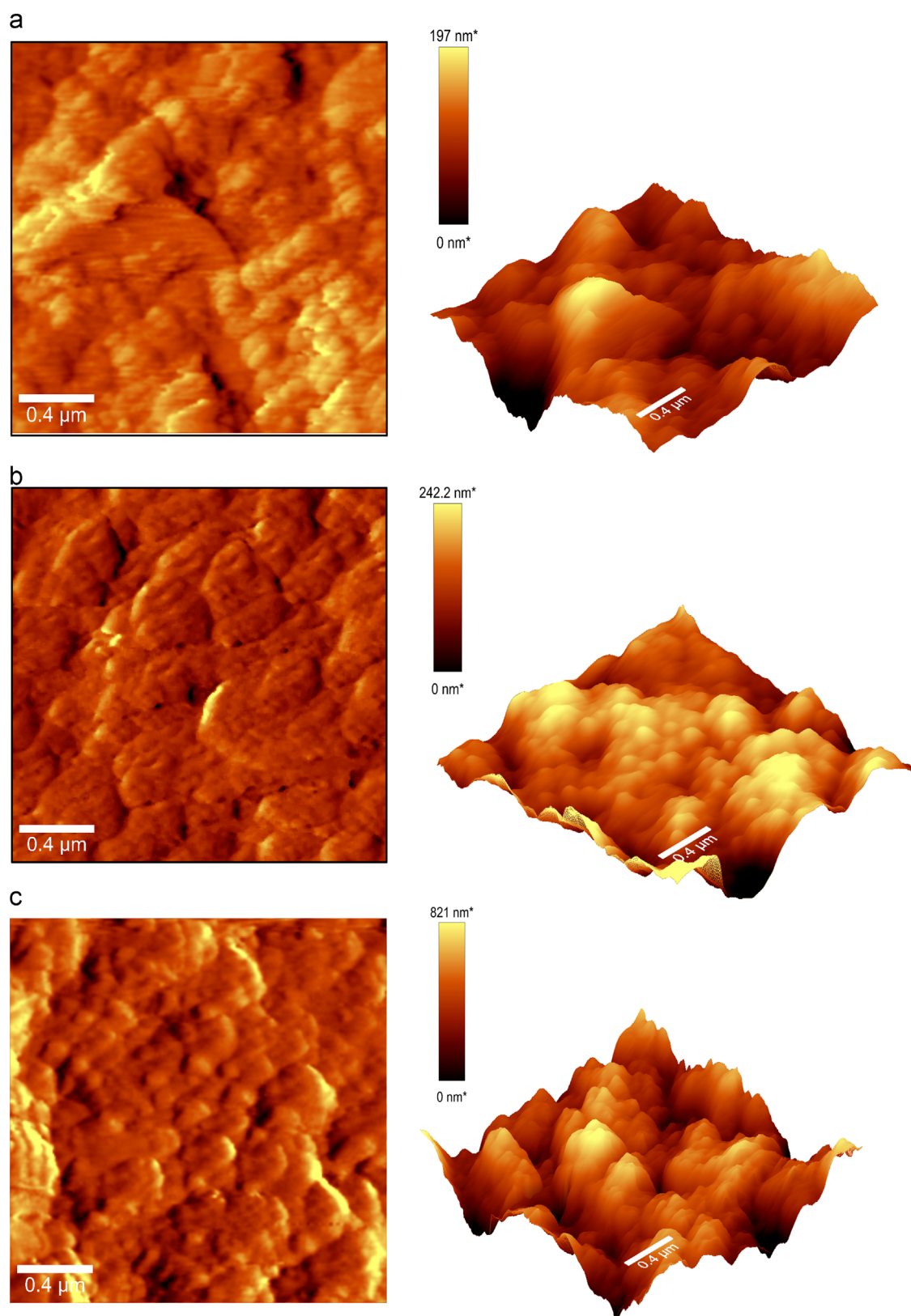
Fig. 3. ATR FT-IR spectra of the SPE (a) without  $\text{NH}_2$ -CNT and (b) with  $\text{NH}_2$ -CNT.

groups at  $1444 \text{ cm}^{-1}$  and  $1368 \text{ cm}^{-1}$  that could be attributed to the presence of  $\text{NH}_2$ -CNTs in the carbon ink [21].

AFM was used to characterize the morphology of the CNT-SPEs. The topographic surface of the CNT-SPE was characterized by amorphous structures typical of polymeric films with an average roughness of  $272.5 \text{ nm}$  (Fig. 4a). After electrochemical pretreatment, the average roughness decreased to  $124.4 \text{ nm}$  (Fig. 4b) due to the removal of impurities and organic contaminants on the sensor surface. When anti-cTnT antibodies were pipetted onto the electrode surface ( $10 \mu\text{L}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and incubated for 60 min, the average roughness increased to  $273.1 \text{ nm}$ , confirming that the anti-cTnT antibodies had been successfully immobilized (Fig. 4c).

#### 3.2. Immobilization of the anti-cTnT

The amine groups of the CNTs were used to promote a covalent immobilization of the anti-cTnT antibodies via amide bonds. For this procedure, the Fc terminal of the anti-cTnT antibodies were activated by EDC/NHS mixing. EDC reacts with the carboxyl groups of the antibodies to form amine-reactive *o*-acylisourea intermediates. Addition of NHS stabilizes the amine-reactive intermediate and increases the efficiency of EDC-mediated coupling reactions. In situ activation of anti-cTnT antibodies yields NHS-ester-terminated Fc regions that are susceptible to nucleophilic attack from amines on the electrode surface to form stable amide bonds [32]. Oriented anti-cTnT immobilization by Fc terminal improves the sensitivity and selectivity of the immunosensor by exposing the Fabs, which exhibit a high affinity towards epitopes of the cTnT antigens.



**Fig. 4.** 2D and 3D AFM images of the CNT-SPE (a) as manufactured, (b) after electrochemical pretreatment and (c) after anti-cTnT immobilization.

The amount of antibody immobilized on the electrode surface also affects the sensitivity of the immunosensor. In order to obtain a maximal efficiency on the attached anti-cTnT to electrode surface, the exposure time to the EDC/NHS by anti-cTnT was optimized. Herein, the exposure time ranged from 15 min to 120 min

with anti-cTnT at  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . It was observed an increase of the exposure time with increase of the DPV peaks, reaching a plateau at 90 min (Fig. S1—Supplementary data). In this instant, a maximal amount of anti-cTnT Fc portions were activated resulting in more amide bonds with the  $\text{NH}_2$ -CNTs.

### 3.3. Assembling the SPE

In Fig. 5a, the CV of the CNT-SPE as manufactured shows a  $\Delta E_p$  of 0.68 V (curve I). After electrochemical pretreatment (curve II), the  $\Delta E_p$  decreased to 0.38 V, which illustrates a decrease of electron transfer resistance by removing of organic contaminants or impurities from the electrode surface. On the other hand, when the anti-cTnT was pipetted on the CNT-SPE it was, observed a decrease in the redox peaks as a result of electron-transfer inhibition due to the insulating nature of the antibody (curve III). The blocking effect to non-specific binding was observed after incubation with glycine (50 mmol L<sup>-1</sup>) (curve IV). The negatively charged glycine acts by hindering the electron transfer between the anionic species of the electrolyte and the electrode surface, as demonstrated by a slight reduction in redox peaks.

CNT-SPE assembly also was evaluated by EIS. The electrodes were submitted to an electrochemical cell with K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) prepared in PBS (10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.4). According to the Nyquist plot showed in Fig. 5b, it was observed, after electrochemical pretreatment a reduction in the charge-transfer resistance ( $R_{ct}$ ) from 5805  $\Omega$  (curve I) to 665  $\Omega$  (curve II), by decreasing the diameter of the semicircles. Immobilization of the anti-cTnTs were confirmed by an increase in the  $R_{ct}$  (768  $\Omega$ ,

curve III), due to their insulating nature. Glycine, the blocking agent, also was linked on the electrode surface as confirmed by an increase in the diameter of the semicircle ( $R_{ct}$ =966  $\Omega$ , curve IV). These results are in accordance with those obtained using CV.

In order to study electron diffusion at the sensor interface, glycine/anti-cTnT/CNT-SPEs were submitted to different scan rates. The electrodes were immersed in an electrochemical cell containing K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) in PBS (10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.4) as the redox probe, and voltammograms were registered (Fig. S2—Supplementary data). The currents of the anodic peak ( $I_{pa}$ ) and the cathodic peak ( $I_{pc}$ ) increased linearly with the square root of the scan rate (Fig. S2—Supplementary data, inset). The following linear regression equations then were calculated:  $I_{pa}=14.857\nu^{1/2}+21.502$  ( $r=0.999$ ) and  $I_{pc}=-14.035\nu^{1/2}-33.578$  ( $r=0.996$ ). These equations suggested a diffusion-controlled process. The electroactive surface area of the glycine/anti-cTnT/CNT-SPE was calculated according to the Randles–Sevcik equation [22] to be 0.047 cm<sup>2</sup>.

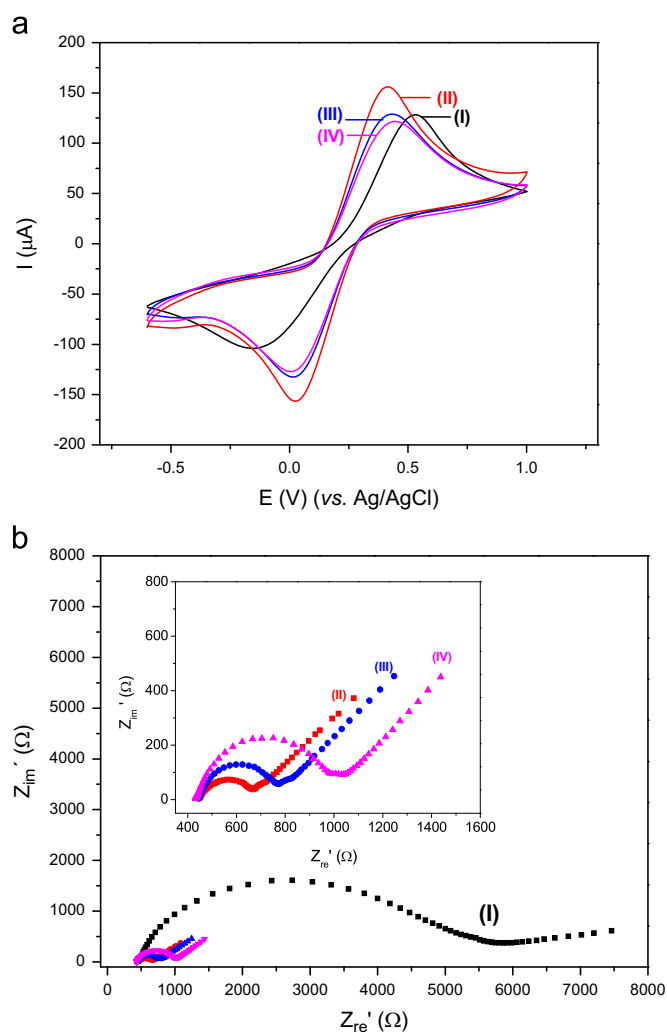
### 3.4. Experimental conditions

Optimal experimental conditions for immunosensor detection were investigated according to the pH and ionic strength of the buffer (PBS). Electrostatic intermolecular forces of the electrolyte can affect electron transfer on the electrode surface [33]. The pH of PBS (10 mmol L<sup>-1</sup>) was varied from 5.5 to 8.0; the current increased proportionately with the pH achieving a maximal current peak at pH 6.5 (Fig. S3a—Supplementary data). Therefore, pH 6.5 was adopted for all remaining measurements. The ionic strength was varied from 0.01 mmol L<sup>-1</sup> to 10 mmol L<sup>-1</sup>, and steady state was achieved at 5 mmol L<sup>-1</sup> (Fig. S3b—Supplementary data).

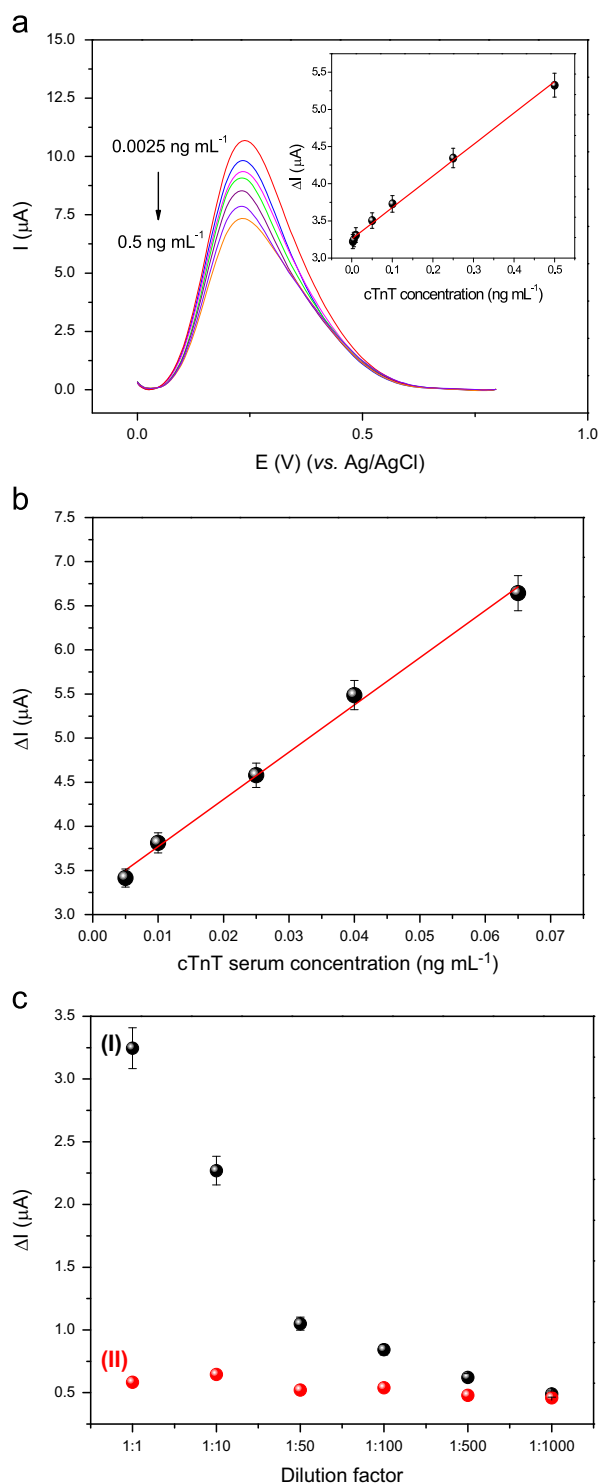
Additional parameters affecting immunosensor performance include the immobilized antibody load and the incubation time of the cTnT. The anti-cTnT antibody concentration was varied from 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The current response to a fixed concentration of cTnT (0.05 ng mL<sup>-1</sup>) in PBS was proportional to the anti-cTnT concentration with a plateau at approximately 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  anti-cTnT (Fig. S4a—Supplementary data). At this anti-cTnT concentration, a 40 min incubation time was optimal as demonstrated by a plateau in the curve (Fig. S4b—Supplementary data), which suggested maximal antigen–antibody interaction.

### 3.5. Analytical response to the cTnT

Under optimized experimental conditions, the calibration curve of the immunosensor was obtained. The electrodes were incubated in various concentrations of cTnT for 40 min and then were submitted to DPV measurements in the presence of K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) in PBS (5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6.5). The calibration curve indicated a gradual decrease in DPV current peaks with increased cTnT concentrations (Fig. 6a). When the data were adjusted to a linear regression equation,  $\Delta I=3.25 \cdot C_{\text{cTnT}}+4.2$ , a correlation coefficient of 0.995 ( $p < 0.0001$ ,  $n=7$ ) and a low relative error ( $\ll 1\%$ ) were obtained (Fig. 6a, inset). Based on the RSD of the blank and the slope of the calibration curve, the LOD was calculated as:  $\text{LOD}=3(\text{RSD}/\text{slope})$  [34]. CNT-SPEs exhibited a lower LOD (0.0035 ng mL<sup>-1</sup>) than previously described for cTnT electrochemical immunosensors [15–18]. One of limitations encountered for these labeled immunosensors is associated with the interaction or passivation of the electrode by requirement of an enzyme substrate or chemical mediator [35]. Moreover, limitations related to Michaelis–Menten kinetic imply an increase in the analyses time and a reduced sensitivity.



**Fig. 5.** Stepwise the CNT-SPE preparation: (curve I) as manufactured, (curve II) after electrochemical pretreatment, (curve III) anti-cTnT/CNT-SPE, (curve IV) glycine/anti-cTnT/CNT-SPE (a) CVs and (b) Nyquist plots in K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) prepared in PBS (10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.4).



**Fig. 6.** (a) DPVs of immunosensor response to different the cTnT concentrations (0.0025 to 0.5 ng mL<sup>-1</sup>) in presence of K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) in PBS (5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6.5). *Inset*: linear fit of the calibration curve. (b) Analytical CNT-SPE responses to the cTnT measured in serum samples and (c) matrix effect study performed by successive serum dilution of samples from (curve I) myocardial infarcted and (curve II) non-myocardial infarcted patients. Error bars are based on the standard deviation of three replicates.

### 3.6. Repeatability and reproducibility

The repeatability of the CNT-SPE was evaluated by replicate measurements of a single electrode in response to 0.05 ng mL<sup>-1</sup> cTnT

under optimized experimental conditions. An RSD value of 3.2% was found for five successive determinations corresponding to a good repeatability of the immunosensor. The reproducibility was also evaluated using ten CNT-SPEs manufactured on different days and measured in response to 0.05 ng mL<sup>-1</sup> cTnT. The obtained RSD was 3.8%, which implies a good reproducibility and repeatability in the fabrication procedures.

### 3.7. Determination of cTnT in serum samples

Fig. 6b shows the amperometric responses of the CNT-SPEs to cTnT serum samples. The immunosensor measurements were compared with those using ECLIA. The results showed good agreement with ECLIA at a 95% confidence level when the paired *t*-test was applied. The calibration plot exhibited a good linear correlation ( $r=0.990$ ,  $p<0.0001$ ), and a linear range of detection was observed between 0.005 ng mL<sup>-1</sup> and 0.065 ng mL<sup>-1</sup> cTnT. This range is comparable to the clinical range, which is associated with a cutoff of 0.01 ng mL<sup>-1</sup> cTnT [36]. The LOD of CNT-SPEs for cTnT in serum samples was found to be approximately 0.007 ng mL<sup>-1</sup>.

The matrix effect on the analytical response of CNT-SPEs also was evaluated (Fig. 6c). Blood serum from a non-myocardial infarction subject was diluted 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, and 1:1000 and then was compared to a myocardial infarction subject's serum, containing 0.01 ng mL<sup>-1</sup> cTnT. All dilutions were carried out using PBS (10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.4). The serum dilution curve obtained from the non-myocardial infarction subject (curve I) was maintained practically constant, showing a non-matrix effect. This proposed label-free immunosensor is simpler, more rapid, and more practical for cTnT detection in blood serum and can be carried out by one-step manufacturing in addition to low cost requirements.

## 4. Conclusions

A disposable CNT-SPE was developed for the measurement of cTnT in blood serum. The incorporation of NH<sub>2</sub>-CNT into the carbon ink enabled a more stable measurement and an oriented anti-cTnT immobilization leading to a high sensitivity. Additionally, the platform dispensed chemical mediators, compounds or polymers to anchor the CNTs. The CNT-SPE described in this study achieved a high sensitivity and a low LOD (0.0035 ng mL<sup>-1</sup>) of cTnT compared to others electrochemical immunosensors. The linear range was obtained within cTnT clinical levels for AMI diagnostics, although further validation studies with real samples are required before clinical use.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) agency from Brazil. Bárbara V.M. Silva thanks to Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil foundation, for the scholarship during this work. The assistance of the Northeast Center for Strategic Technologies (Recife, Brazil) and Central Analytical of Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil) are also acknowledged.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.059>.

## References

- [1] J.S. Alpert, K. Thygesen, E. Antman, J.P. Bassand, J. Am. Coll. Cardiol. 36 (2000) 959–969.
- [2] K. Thygesen, J.S. Alpert, H.D. White, Eur. Heart J. 28 (2007) 2525–2538.
- [3] S. Mendis, K. Thygesen, K. Kuulasmaa, S. Giampaoli, M. Mahonen, K. Ngu Blackett, L. Lisheng, Int. J. Epidemiol. 40 (2011) 139–146.
- [4] H.A. Katus, A. Remppis, S. Looser, K. Hallermeier, T. Scheffold, W. Kubler, Mol. Cell. Cardiol. 21 (1989) 1349–1353.
- [5] G. Klein, M. Kampmann, H. Baum, T. Rauscher, T. Vukovic, K. Hallermayer, H. Rehner, M. Müller-Bardorff, H.A. Katus, Wien. Klin. Wochenschr. 110 (1998) 40–51.
- [6] R.F. Dutra, R.K. Mendes, V. Lins da Silva, L.T. Kubota, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1744–1750.
- [7] R.F. Dutra, L.T. Kubota, Clin. Chim. Acta 376 (2007) 114–120.
- [8] H. Andersson, B. Kågedal, C.-F. Mandenius, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 1395–1402.
- [9] J.T. Liu, C.J. Chen, T. Ikoma, T. Yoshioka, J.S. Cross, S.J. Chang, J.Z. Tsai, J. Tanaka, Anal. Chim. Acta 703 (2011) 80–86.
- [10] K. Wong-ek, O. Chailapakul, N. Nuntawong, K. Jaruwongrungrsee, A. Tuantranont, Biomed. Tech. (Berlin) 55 (2010) 279–284.
- [11] R.A. Fonseca, J. Ramos-Jesus, L.T. Kubota, R.F. Dutra, A Nanostructured, Sensors 11 (2011) 10785–10797.
- [12] A.B. Mattos, T.A. Freitas, V. Lins da Silva, R.F. Dutra, Sens. Actuators, B 161 (2012) 439–446.
- [13] J. Wang, Chem. Rev. 108 (2008) 814–825.
- [14] V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Anal. Chem. 84 (2012) 487–515.
- [15] B.M.V. Silva, I.T. Cavalcanti, A.B. Mattos, P. Moura, M. del, P. Sotomayor, R. F. Dutra, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 1062–1067.
- [16] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gomez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, Electroanalysis 24 (2012) 1–8.
- [17] S.L.R. Gomes-Filho, A.C.M.S. Dias, M.M.S. Silva, B.V.M. Silva, R.F. Dutra, Microchem. J. 109 (2013) 10–15.
- [18] A.B. Mattos, T.A. Freitas, L.T. Kubota, R.F. Dutra, Biochem. Eng. J. 71 (2013) 97–104.
- [19] B.E. Rapp, F.J. Gruhl, K. Länge, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 2403–2412.
- [20] J. Lin, Z. Wei, H. Zhang, M. Shao, Biosens. Bioelectron. 41 (2013) 342–347.
- [21] K.-J. Huang, D.-J. Niu, J.-Y. Sun, J.-J. Zhu, J. Electroanal. Chem. 656 (2011) 72–77.
- [22] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, New York, 2000.
- [23] P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Trends Analyst Chem. 29 (2010) 938–953.
- [24] P.J. Lamas-Ardisana, P. Queipo, P. Fanjul-Bolado, A. Costa-García, Anal. Chim. Acta 615 (2008) 30–38.
- [25] M. Pumera, A. Merkoci, S. Algeret, Sens. Actuators, B 113 (2006) 617–622.
- [26] C. Lynam, N. Gilmartin, A.I. Minett, R. O'Kennedy, G. Wallace, Carbon 47 (2009) 2337–2343.
- [27] S. Puertas, M.G. Villa, E. Mendoza, C. Jiménez-Jorquera, J.M. Fuente, C. Fernández-Sánchez, V. Gazu, Biosens. Bioelectron. 43 (2013) 274–280.
- [28] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L.D.T.D. Román, M.J. Arcos-Martínez, Anal. Chim. Acta 688 (2011) 49–53.
- [29] F. Valentini, A. Amine, S. Orlanducci, M.L. Terranova, G. Palleschi, Anal. Chem. 75 (2003) 5413–5421.
- [30] T.T. Nguyen, M. Raupach, L.J. Janik, Clays Clay Miner. 35 (1987) 60–67.
- [31] P. Griffiths, J.A.D. Haseth, Fourier Transform Infrared Spectrometry, John Wiley & Sons, New York, 2007.
- [32] Z. Pei, H. Anderson, A. Myrskog, G. Dunér, B. Ingemarsson, T. Astrup, Anal. Biochem. 398 (2010) 161–168.
- [33] V. Dugas, A. Elaissari, Y. Chevalier, Surface Sensitization techniques and recognition receptors immobilization on biosensors and microarrays, in: M. Zourob (Ed.), Recognition Receptors in Biosensors, Springer, New York, 2010, pp. 47–134.
- [34] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem. 55 (1983) 713A–724A.
- [35] F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi, Electrochim. Acta 84 (2012) 74–83.
- [36] M.P. Hudson, C.M. O'Connor, W.A. Gattis, G. Tasissa, V. Hasselblad, C. M. Holleman, L.H. Gauden, F. Sedor, E. Magnus Ohman, Am. Heart J. 147 (2004) 546–552.

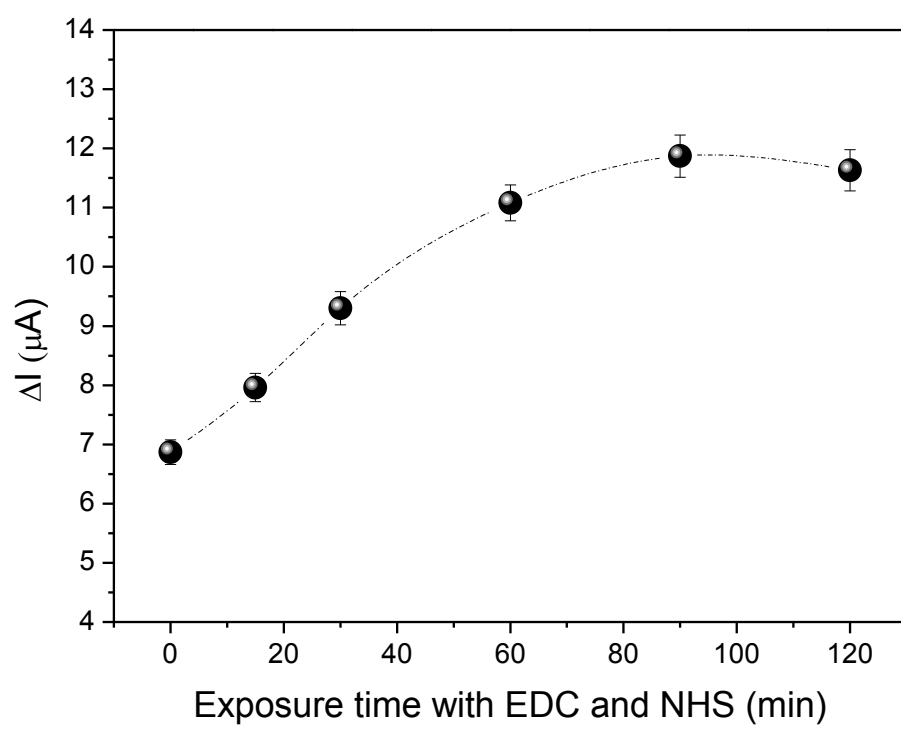
## Supplementary data

**Figure S1.** Influence of the exposure time of the anti-cTnT with EDC and NHS solution on DPV response of CNT-SPE. Currents responses obtained in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4).

**Figure S2.** CVs of glycine/anti-cTnT/CNT-SPE at different scan rates (a  $\rightarrow$  i: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200 mV/s, respectively) in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) containing PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4). *Inset* curve: plot of the anodic ( $I_{pa}$ ) and cathodic ( $I_{pc}$ ) current peak with the square root of scan rate.

**Figure S3.** Influence of (a) pH values and (b) ionic strength of PBS containing  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) on CNT-SPE with the immobilized anti-cTnT and incubated with cTnT ( $0.05 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

**Figure S4.** Effect of (a) antibody concentration and (b) immunoreaction time of CNT-SPE. DPV analysis obtained in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) prepared in PBS ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6.5).



**Figure S1**

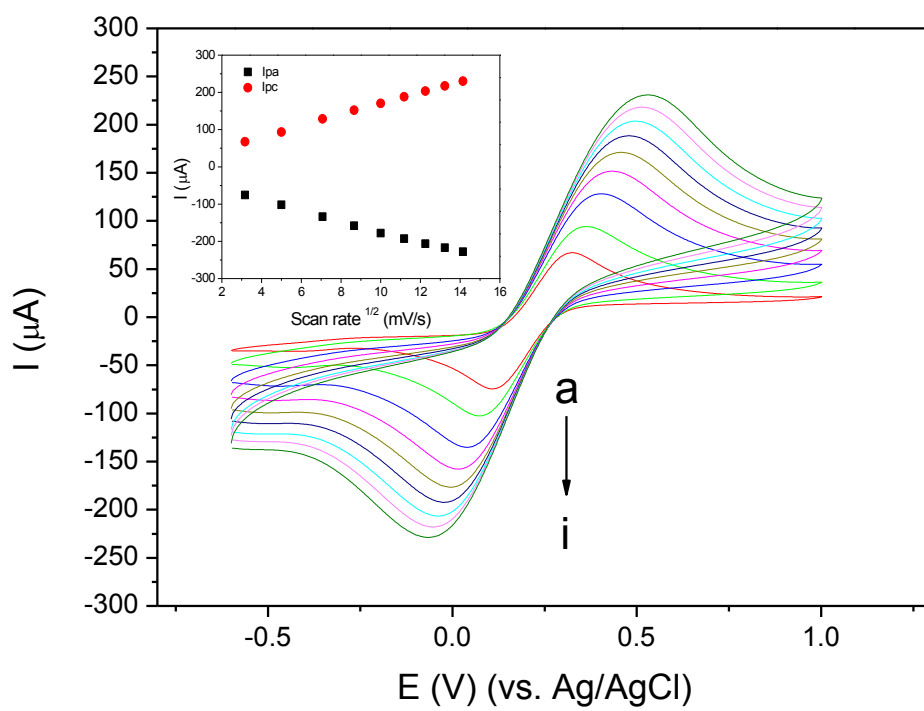


Figure S2

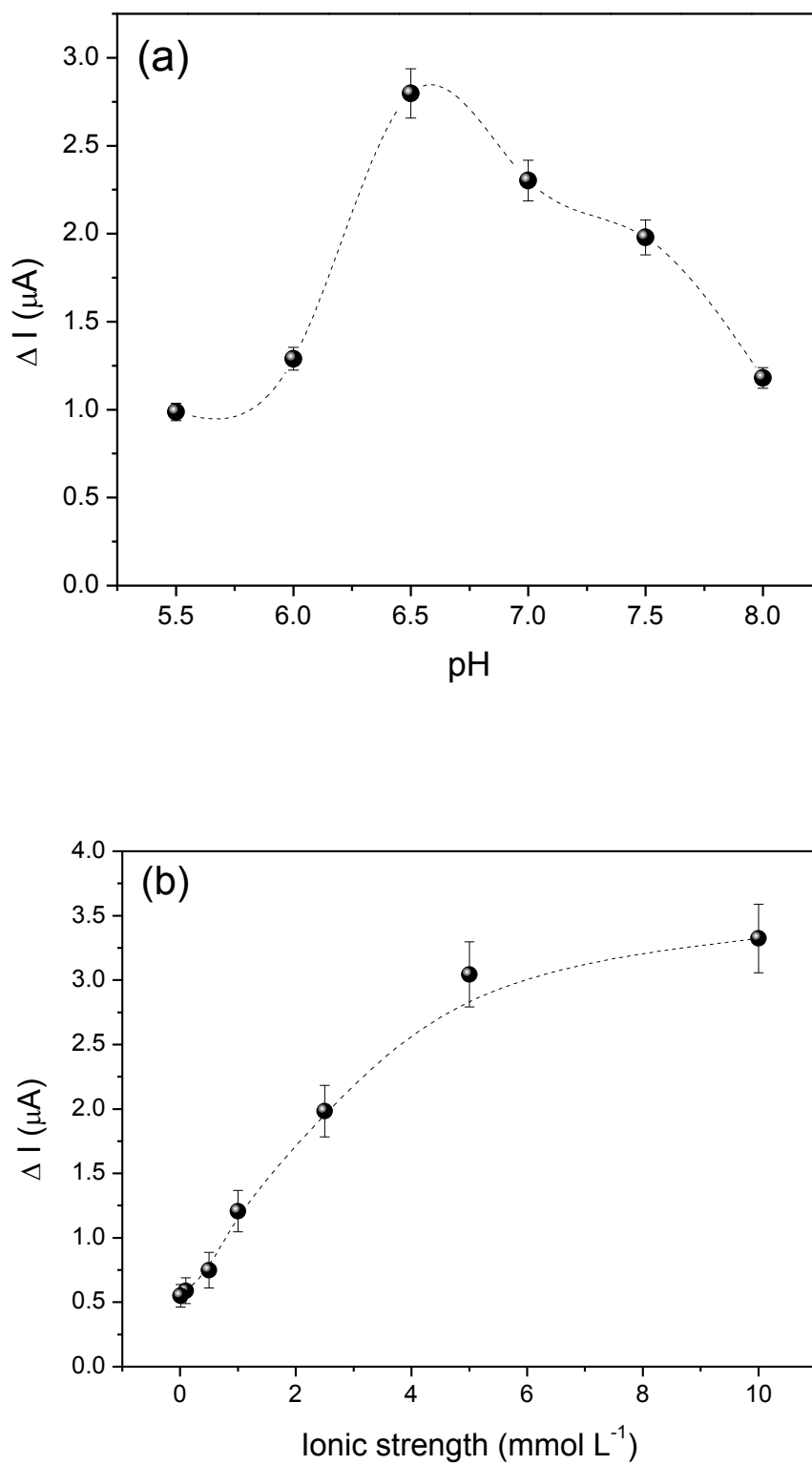


Figure S3

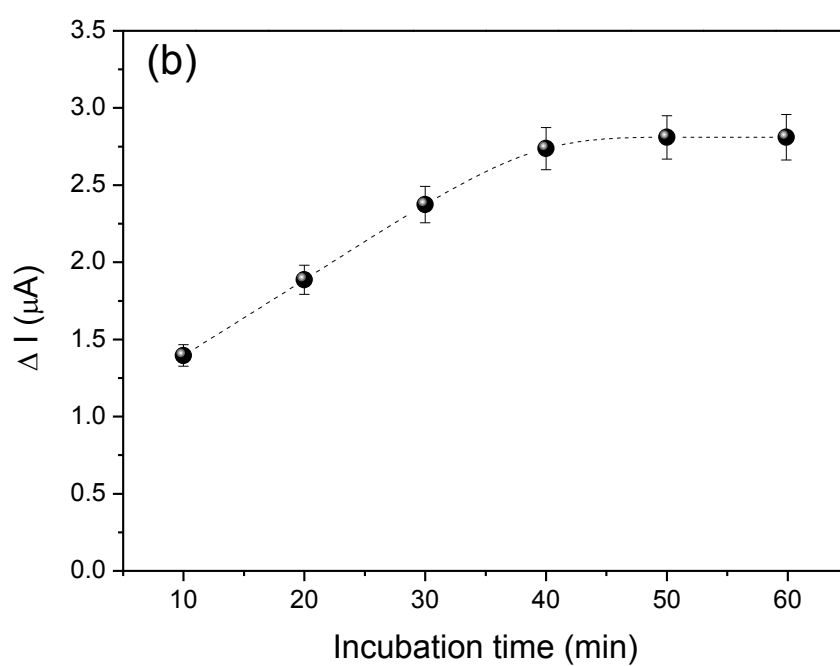
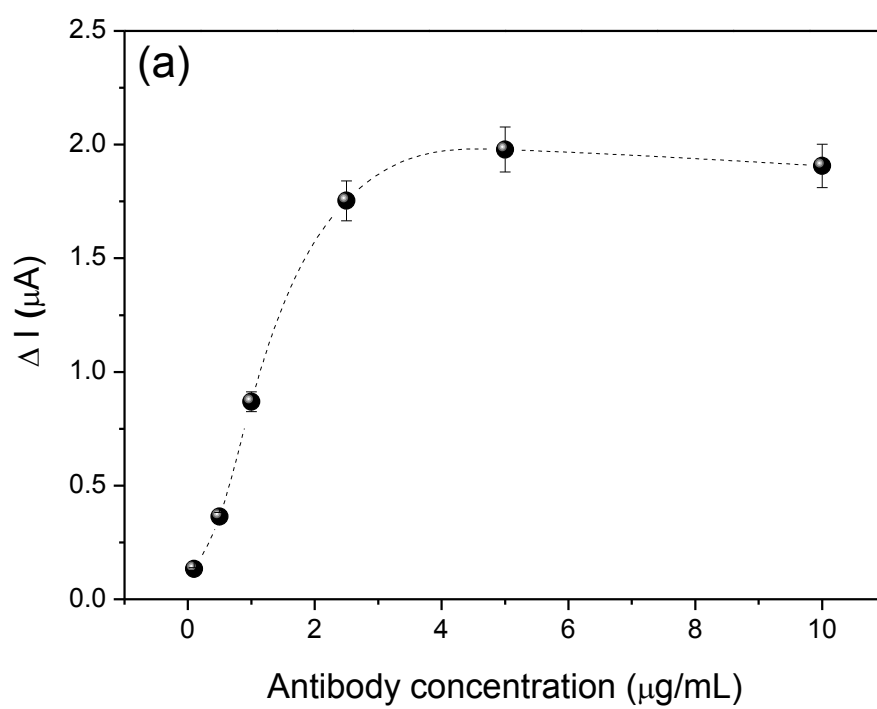
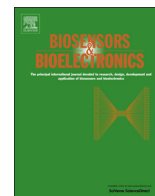


Figure S4

## 4.2 Manuscrito II

Manuscrito publicado  
no periódico *Biosensors and Bioelectronics*





# An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer

Bárbara V.M. Silva<sup>a</sup>, Blanca A.G. Rodríguez<sup>a</sup>, Goreti F. Sales<sup>b</sup>, Maria Del Pilar T. Sotomayor<sup>c</sup>, Rosa F. Dutra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>b</sup> BioMark/ISEP, School of Engineering, Polytechnic Institute of Porto, Porto, Portugal

<sup>c</sup> Chemistry Institute, State University of São Paulo (UNESP), Araraquara, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 July 2015

Received in revised form

22 October 2015

Accepted 26 October 2015

Available online 28 October 2015

### Keywords:

Cardiac troponin T

Molecularly imprinted polymer

Pyrrole

Acid carboxylic-3-pyrrole

Graphene

Point-of-care testing

## ABSTRACT

A nano-molecularly imprinted polymer (N-MIP) assembled on a screen-printed electrode for the cardiac troponin T (cTnT) was developed. The biomimetic surface was obtained by a co-polymer matrix assembled on the reduced graphene oxide (RGO) electrode surface. The cTnT active sites were engineered using pyrrole and carboxylated pyrrole that was one-step electropolymerized jointly with cTnT by cyclic voltammetry. The stepwise preparation of the biomimetic surface was characterized by cyclic and differential pulse voltammetries using the ferrocyanide/ferricyanide as redox probe. Structural and morphological characterization was also performed. The optimal relation of pyrrole and pyrrole-3-acid carboxylic to perform the cTnT biomimetic nanosurface was obtained at 1:5 ratio. The analytical performance of cTnT N-MIP performed by differential pulse voltammetry showed a linear range from 0.01 to 0.1 ng mL<sup>-1</sup> ( $r=0.995$ ,  $p<0.01$ ), with a very low limit of detection (0.006 ng mL<sup>-1</sup>). The synergic effect of conductive polymer and graphene forming 3D structures of reactive sites resulted in a N-MIP with excellent affinity to cTnT binding ( $K_D=7.3 \cdot 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup>). The N-MIP proposed is based on a simple method of antibody obtaining with a large potential for point-of-care testing applications.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Molecularly imprinted polymer (MIP) is a well-known process that allows the manufacture of biomimetic receptors, which is based on the use of specific polymers with a high chemical stability, easy synthesis and low cost. The selectivity of interactions established between biomimetic and target molecules in MIPs provides an interesting substitute to the natural receptors (Ding and Heiden, 2014). Conventionally, the MIP involves the polymerization of functional monomers in presence of a template, which is removed to form specific polymeric cavities against the template or target analyte. During this process, a number of functional monomers are orderly assembled with their functional groups to build suitable sites within the cavities (Hong et al., 2013). MIPs have been used for molecular recognition systems ranging from small molecules to proteins. However, the tailor-made concept of MIPs to protein should be carefully considered

since that their complex structure and molecular size can influence the sensibility of imprinted sites for recognizing the target molecules (Chen et al., 2014; Rossetti and Qader, 2014).

The bulk polymerization technique is a usual method for MIP obtaining. However, this technique presents some limitations for biomimetic sensor applications due to the difficulty to assembly the MIP composite on the electrode surface, maintaining the binding sites exposure to the target molecules (Soleimani et al., 2013). On the other hand, the removal of the target molecules into a composite is a hard task, mainly when the template is tightly attached to the sensor platform (Ding and Heiden, 2014). Recent strategies using the surface imprinting method for constructing the thin-film of protein MIPs have allowed biomimetic sites on the sensor surface constituting integrated systems of biorecognizing (Moreira et al., 2014). The screen-printed electrodes (SPEs) have been pointed as potential sensor substrates to develop unique systems of disposable MIPs, offering a great potential for point-of-care testing applications. SPE technology involves a simple and low cost manufacturing, in which processes are based on the ink printing on the solid substrates, enabling the mass production of

\* Corresponding author. Fax: +55 81 2126 8000.

E-mail address: [rosa.dutra@ufpe.br](mailto:rosa.dutra@ufpe.br) (R.F. Dutra).

biomimetic sensors.

Recently, some reports have been described for synthesizing the MIP directly on the SPE via surface imprinting method (Prasad et al., 2013; Cabral-Miranda et al., 2014; Moreira et al., 2014). This new approach facilitates an effective extraction of templates, promoting more sensitivity on the biomimetic sensor due to an increase in the rebinding events, besides the electron transfer to be enhanced due to the nearness of the reactive imprinted sites on sensor surface. Although this approach presents several advantages, the sensitivity of biomimetic sensor is compromised by the monomers employed, which can result in a non-conductive imprinted matrix. Conductive polymers have been described for polymeric matrix assembling, such as polypyrrole (PPy) (Nezhadali et al., 2013), polythiophene (Huynh et al., 2013), polyaniline (Xue et al., 2014) and poly-3,4-ethylenedioxythiophene (Granado et al., 2014). Among them, the PPy is an attractive candidate for surface imprinting of the MIP due to the easy electrochemical synthesis, high conductivity and good biocompatibility. Additionally, the use of monomers derivatives of the pyrrole (Py) with organic groups is a good strategy to improve the molecular interaction and selectivity established between template molecules and biomimetic sites (Kim et al., 2015).

Graphene is a two-dimensional carbon network nanomaterial that has been applied on the last few years for transistors, photodetectors and resonators due to its excellent electrical properties. Recent studies have showed improvements on the conductivity of graphene, when is thermal, chemical or electrical reduced to form reduced graphene oxide (RGO). After reduction, the disrupted  $sp^2$  bonds of GO are re-established improving the electronic transfer (Calvo et al., 2015; Cinti et al., 2015). In order to further improve the electronic transfer on the graphene modified electrode, the use of conductive polymers can serve as a strategy. Herein, the synergism between RGO and PPy was used to increase the electron transfer; beside promote more amounts of biomimetic sites due to the nanostructured electrode surface area.

Cardiac troponin T (cTnT) is a sensitive and specific biomarker for diagnostic of the acute myocardial infarction (AMI), the most frequent cardiovascular disease in emergency department in the worldwide. cTnT (37 kDa) is released rapidly of the contractile apparatus in cardiac muscle within 2–4 h after AMI onset and can be kept on elevated up to 14 days enabling risk stratify and prognostic of the patients (Thygesen et al., 2012). This work proposed a nanosurface-molecularly imprinted polymer (N-MIP) sensor for cTnT detection based on the electropolymerization of the Py, pyrrole-3-carboxylic acid (COOH-3-Py) and pyrrole-2-carboxylic acid (COOH-2-Py) monomers on the RGO modified SPE. Different combinations and ratio of the Py monomers was investigated in order to obtain a sensible thin-film of cTnT MIP. The N-MIP sensor was evaluated by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) techniques and further it was applied for analyze of standard and serum samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Py (98%), COOH-3-Py ( $\geq 96\%$ ), COOH-2-Py ( $\geq 99\%$ ), potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), potassium ferrocyanide ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) and oxalic acid ( $\geq 99\%$ ) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Lithium perchlorate ( $LiClO_4$ ) was acquired from Vetec (Rio de Janeiro, BRA). The cTnT purified from human cardiac muscle tissue was purchased from Calbiochem (Darmstadt, DEU). For the manufacture of the SPE was used the following reagents: graphite powder acquiring from Fluka (St. Louis, USA) and carbon ink (Electrodag PF-407 C) purchasing from Acheson (Port Huron,

USA). Phosphate buffer (PB) ( $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5.8) was used in all experiments for dilution of the samples. Ultrapure water obtained from a Millipore water purification system ( $18 \text{ M}\Omega$ , Milli-Q, Millipore) was utilized in all assays. All chemicals were of analytical grade.

Blood serum samples were collected from patients with AMI who were admitted to the Cardiac Emergency Hospital of Pernambuco-PROCAPE (Recife, BRA). An automatic Elecsys 2010 Immunoassay Analyzer (Roche Diagnostics) was used to quantify cTnT via an electrochemical chemiluminescence immunoassay (ECLIA). Samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  while not in use during the electrochemical measurements.

### 2.2. Synthesis of the RGO

RGO was synthesized by the method of Hummers and Offeman (1958), this consisted in using a mixture of 3 g of graphite, 60 mL of  $H_2SO_4$  and 1.5 g of  $NaNO_3$ , which was kept in an ice bath under magnetic stirring for 24 h. Subsequently, 7 g of  $KMnO_4$ , 60 mL of  $H_2SO_4$ , and 1.5 g of  $NaNO_3$  was added. The resulting mixture is maintained at low temperature under stirring for 24 h; after that, this is left to rest for 24 h. The material is washed with water until a pH  $\sim 7$  is reached and was obtained graphene oxide (GO). The reduction of graphene is placed 100 mg of GO powder in an oven at  $500^\circ\text{C}$  and leave for 5 min, then it is cooled to room temperature, getting RGO powder. Subsequently, a RGO solution was prepared through dispersion of 1 mg of RGO powder in 1 mL of water.

### 2.3. SPE manufacture

The electrode composition (w/w) included a carbon ink modified with graphite powder (10%), which were mixed together during 15 min and then squeezed on the plastic mask over polyethylene terephthalate rectangular surface to obtain a thin film. It contains a circular working area (4.0 mm in diameter) connected to a rectangular area ( $2.0 \text{ mm} \times 10.0 \text{ mm}$ ) that was used as electrical contact. After printing, the electrodes were dried at  $60^\circ\text{C}$  for 20 min and then the mask was removed.

Prior to use, the surface of the as-prepared SPE was firstly polished during 2 min to obtain a mirror surface and then submitted to an electrochemical pre-treatment by recording 40 cyclic voltammograms between 2.0 V and  $-2.0 \text{ V}$  (vs.  $Ag/AgCl_{(KCl \text{ sat.})}$ ) in a KCl solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) (Alonso-Lomillo et al., 2010). The cleaned SPE surface was modified with  $10 \mu\text{L}$  of the RGO solution ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and kept at  $60^\circ\text{C}$  to let solvent evaporate.

### 2.4. N-mip construction

The N-MIP was obtained by electropolymerization using a solution containing the cTnT and functional Py monomers deposited on the RGO modified SPE (Fig. 1). Prior to the electropolymerization, the cTnT ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was incubated with  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  of a mixture of Py and functionalized Py monomers during 2 h at  $4^\circ\text{C}$ . This pre-assembling solution was prepared in order to allow interactions electrostatic between the cTnT and the monomers. The cTnT-monomers solution was electropolymerized on the SPE surface after addition of a  $LiClO_4$  solution ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) prepared in PB ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5.8). The electropolymerization was performed by 20 cyclic voltammograms in the potential range from 0.8 to  $-0.8 \text{ V}$  (vs.  $Ag/AgCl_{(KCl \text{ sat.})}$ ) and scan rate of  $0.02 \text{ V s}^{-1}$ . An oxalic acid solution ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) was dropped on the electropolymerized film in order to remove the cTnT during 10 h at  $4^\circ\text{C}$  in a moist chamber. After this step, the SPE was rinsed with ultrapure water and then submitted to electrochemical experiments. A nanosurface non-molecular imprinting polymer modified

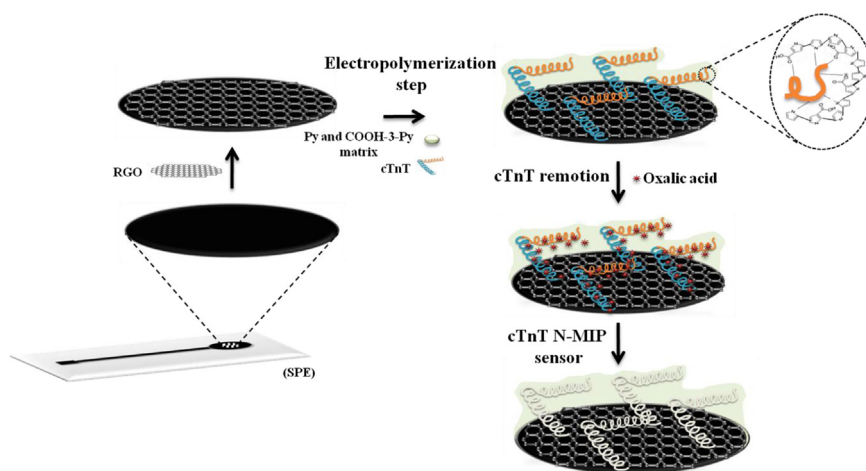


Fig. 1. Stepwise preparation of the biomimetic surface of the N-MIP sensor.

electrode (N-NIP) was prepared as control study. This was synthesized at the same conditions of the N-MIP, except by absence of the cTnT in the electropolymerization process.

## 2.5. Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were performed using the Ivium Compact Stat potentiostat obtained from Ivium Technologies (Eindhoven, NLD) interfaced to a computer system and controlled by Ivium software. An electrode system comprising of the SPE as working electrode, a helical platinum wire as auxiliary electrode and an Ag/AgCl ( $\text{KCl sat.}$ ) electrode as reference was employed in all the electrochemical measurements. The stepwise of the N-MIP construction was obtained through the CV and DPV analyses in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ). CV was scanned in a potential range of 1.0 V to  $-0.6 \text{ V}$ , at  $0.05 \text{ Vs}^{-1}$  scan rate and a step potential of 0.01 V. The DPV was recorded from 0 V to 0.4 V with pulse amplitude of 0.05 V, width of 0.05 s and 0.01 V step potential. The DPV was also employed to monitor the analytical performance of N-MIP and N-NIP sensor in different cTnT concentrations from phosphate buffer and serum samples.

## 2.6. Structural and morphological characterizations

The morphological characterization of the SPE surface was performed by Scanning Electronic Microscopy (SEM) technique by using a FEI Quanta 200 FEG microscope (Eindhoven, NLD). All the SEM analyses were performed using 20 kV acceleration voltages in low-vacuum mode. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy spectra were recorded using a Bruker FT-IR Alpha spectrometer Model IFS-66 (Ettlingen, DEU) in attenuated total reflectance (ATR) mode controlled by OPUS software (version 6.5). The analyses were recorded in wavenumber range of  $4000\text{--}500 \text{ cm}^{-1}$ , at room temperature ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ) and controlled humidity ( $\sim 10\%$ ).

## 2.7. Binding isotherm experiments

The binding properties of the N-MIP and N-NIP were evaluated by calculating the apparent dissociation constant ( $K_D$ ) through DPV assays after recorded of analytical curve in different cTnT concentrations. The correlation between the binding capacity of imprinted sites and the cTnT concentrations in solution was performed using the Langmuir isotherm model (Eq. (1)):

$$I_s = \frac{I_{\max}}{1 + \left(\frac{K_D}{[S]}\right)} \quad (1)$$

where  $I_s$  is the normalized density of the current ( $\text{A cm}^{-2}$ );  $S$ , the concentration of the cTnT ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $I_{\max}$ , the maximum current density observed ( $\text{A cm}^{-2}$ ) and  $K_D$ , binding constant ( $\text{mol L}^{-1}$ ) (Moreira et al., 2014).

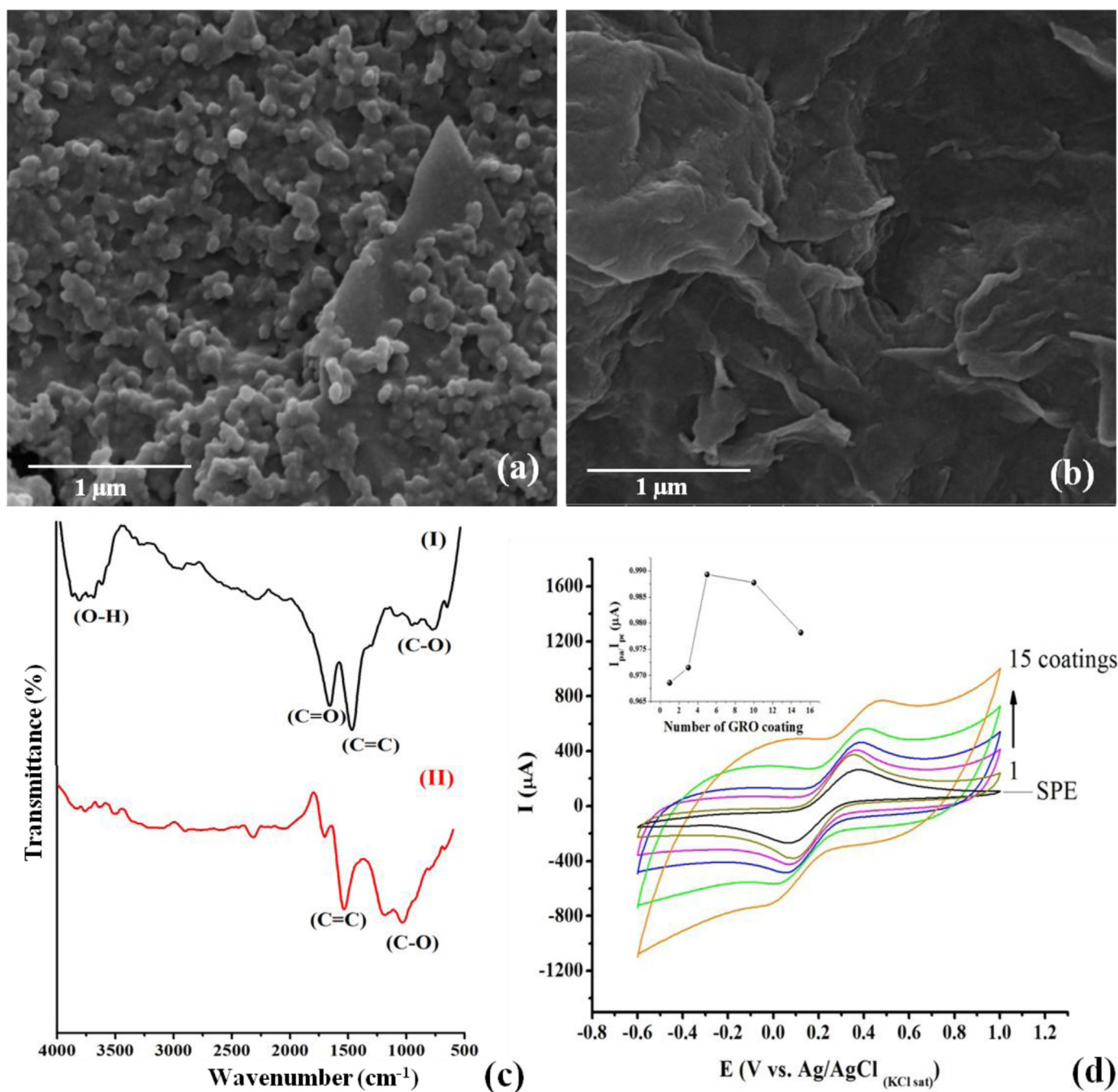
## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of the nanostructured SPE

The SEM micrographs were employed to evaluate the morphology of electrode surface. The bare SPE, in Fig. 2a exhibited the presence of several aggregates attributed to the graphite powder ( $\sim 100 \text{ nm}$ ) mixed in the carbon ink. In Fig. 2b, the micrograph of the RGO modified SPE shows superposition of the graphene sheets, in a random distribution that produce a wrinkled surface. The alignment of the RGO is probably due to the van der Waals interaction between graphene sheets and the carbon sensor surface (Cui et al., 2012).

The functional groups of bare and the RGO modified SPE were evaluated by ATR FTIR spectra (Fig. 2c). In the bare SPE (curve I) was identified the O–H stretching vibrations ( $3300\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$ ), C=O vibrations ( $1720\text{--}1740 \text{ cm}^{-1}$ ), C=C from  $\text{sp}^2$  bonds ( $1570\text{--}1620 \text{ cm}^{-1}$ ) and C–O bonds ( $1250 \text{ cm}^{-1}$ ) (Coates, 2000). The profile spectrum of mercaptan enriched carbon ink shows carbonyl, carboxyl and epoxy groups, beside the hydroxyl group derived from organic solvents present in the printing film. After coating of the electrode surface with RGO, the profile spectrum exhibits C=C from  $\text{sp}^2$  bonds ( $1570\text{--}1620 \text{ cm}^{-1}$ ) typical of graphene structure and C–O bonds ( $1250 \text{ cm}^{-1}$ ) attributed to the edge residual groups (curve II). Herein, graphene used was thermal treated ( $\sim 500^\circ \text{C}$ ) in order to re-establish the disrupted  $\text{sp}^2$  bonds improving the electronic transfer and conductivity (Calvo et al., 2015). The successful of thermal reduction was confirmed by the FTIR spectra. The main functional groups, such as–OH stretching and C=O vibrations, were practically disappeared in the RGO spectra as compared with the GO (Fig. S1A). Additionally, a significant improvement of the conductivity was also accomplished by electrochemical CV technique showing an increase in approximately three times the electroactive area compared with the GO modified electrode (Fig. S1B).

Fig. 2d exhibits the electrochemical profiles of RGO modified electrode. Each voltammogram represents all the consecutive



**Fig. 2.** SEM micrographs of the (a) bare and (b) RGO modified SPE, (c) ATR FT-IR spectra of the bare (curve I) and RGO modified SPE (curve II) and (d) CVs of the SPE modified with successive RGO coatings in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution (inset: correlation between  $I_{pa}/I_{pc}$ ).

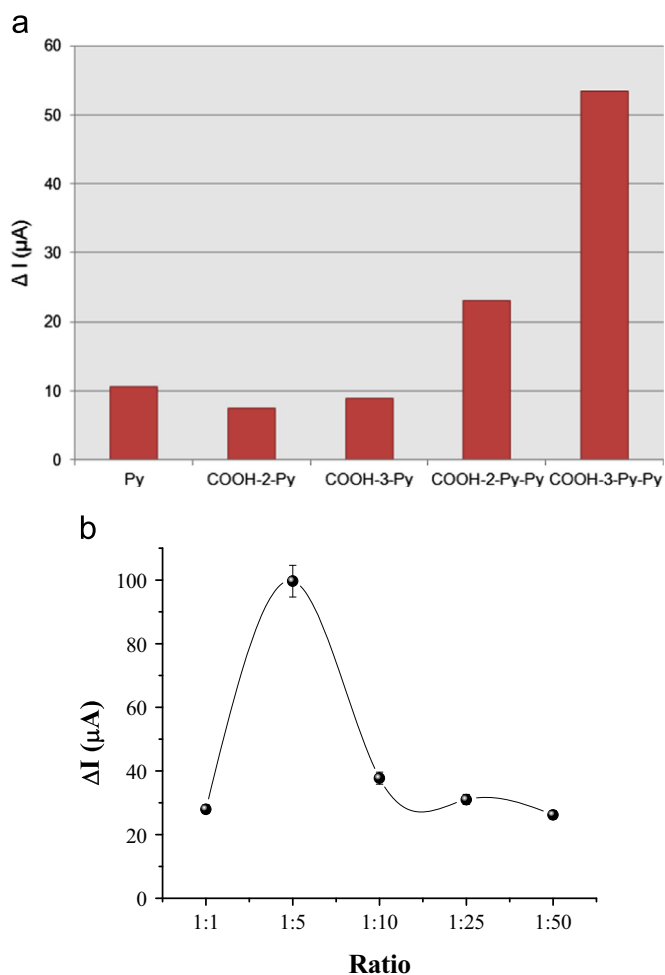
incubations of SPE with RGO dispersing. According to CVs, the assembled graphene film using layer-by-layer technique by dip coatings seems form charge storage elements, or capacitive components on the electrode surface, as resulting the sum of multiples capacitors (in parallel arrangement) interposed dual graphene sheets, as reported by Sato et al. (2011). Herein, the non-faradaic component was electrochemically observed by the CVs according to the over increase of capacitive currents formed by dual alignment of graphene. As shown in Fig. 2d, it is also observed a more evident augment on the current reduction with increase in the number of RGO coatings. This effect can be attributed to the presence of functional groups (carboxyl, hydroxyl, ether) that suffered chemical reduction by thermal treatment on the GO sheets. The ratios between the anodic and cathodic peaks of the CVs ( $I_{pa}$  and

$I_{pc}$ , respectively) according to number of the RGO coatings are plotted in Fig. 2d, inset. It was observed a decrease of the electrochemical reversibility after five RGO coatings.

According to Randles–Sevcik equation (Bard and Faulkner, 2001), there was an increase of 60% in the electroactive area of the RGO modified SPE ( $0.147 \text{ cm}^2$ ) compared with the bare SPE ( $0.09 \text{ cm}^2$ ), showing an improvement of conductivity, due to the higher electronic transfer.

### 3.2. Characterization of the N-MIP sensor

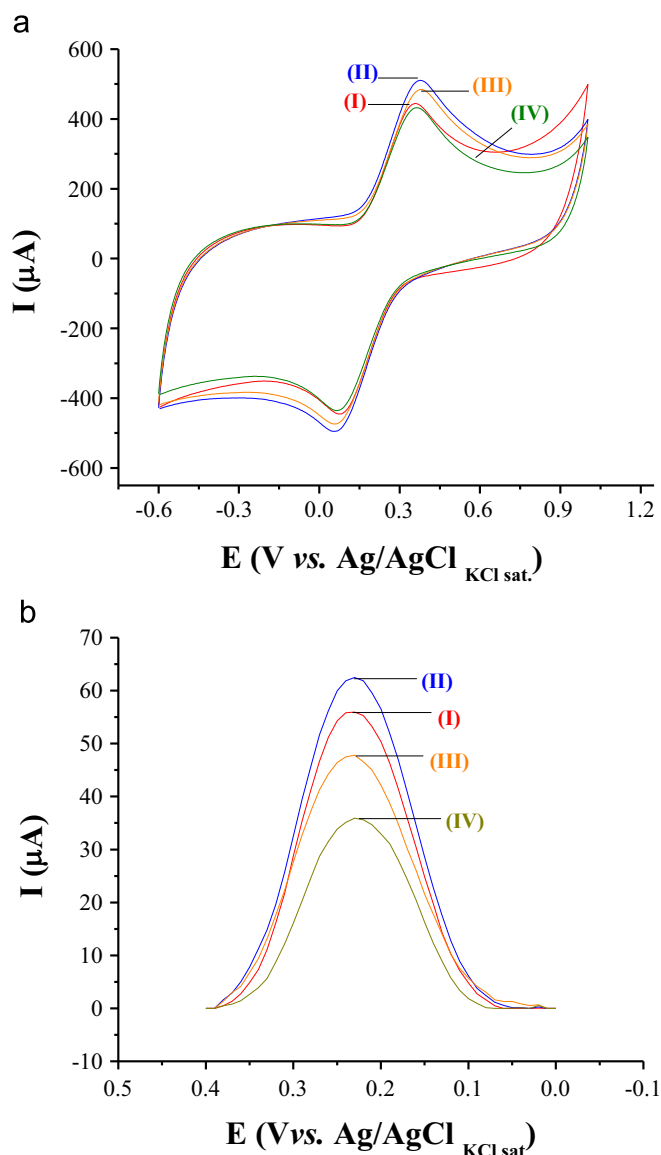
The choice of suitable monomers in the constructing of biomimetic sites is an important step to obtain more selective and sensible MIPs. Firstly, it was focused in a choice of a conductive



**Fig. 3.** (a) Influence of the combinations of the Py monomers in the constructing of the N-MIPs and (b) Py and COOH-3-Py ratio in the N-MIP electropolymerization.  $\Delta I$  values obtained of CVs analyses in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ). All measurements were performed in triplicate.

polymer in order to reach a maximal electron transfer; secondly, the use of organic polymers containing functional groups (carboxyl) in order to obtain more reactive biomimetic sites of the cTnT. In this work, the Py was tested to be copolymerized with COOH-3-Py and COOH-2-Py. The selection of the most selective and sensible N-MIP was carried out through the difference of current values ( $\Delta I$ ) of the analytical response after incubation with cTnT ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). The results showed that the COOH-3-Py monomer was the best to form the biomimetic conductive copolymer (Fig. 3a). In 3 position at monomeric ring linked to the carboxylic group allows to promote more interactions between reactive sites with cTnT, since the interaction these COOH-3-Py monomers in the electropolymerization processes at specific potential occur through oxidative coupling at the 2 and 5 positions of the Py ring (Tighilt et al., 2011; Janmanee et al., 2012). Contrarily, the COOH-2-Py-Py was likely to be less appropriate due to position of functional groups that disfavors the formation of the polymer chain and resulting in a steric hindrance regarding the cTnT interactions. Additionally, the cTnT in the electropolymerization solution is found in the protonated state, contributing for its interaction with the carboxylic groups of the polymeric chain.

The affinity of the molecule template with the monomers influences the formation of template cavities and binding properties of the N-MIP sensor. Thus, the ratio of the Py and COOH-3-Py in relation to cTnT in the pre-assembling solution was optimized. The current responses obtained after rebinding assay with cTnT



**Fig. 4.** Electrochemical profile of the stepwise of constructing of the N-MIP sensor by (a) CV and (b) DPV techniques: (I) RGO modified SPE; (II) after electropolymerization of the Py, COOH-3-Py and cTnT; (III) after removal of the cTnT and (IV) rebinding with cTnT ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Measurements performed in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

showed a maximal value when the Py and COOH-3-Py was found at 1:5 ratio, respectively (Fig. 3b). This result indicates that the cTnT probably was captured mainly by the carboxylic groups of copolymeric matrix. However, other functional groups that appear in oxidation process of the PPy, such as  $-NH$  groups may react with the cTnT template to obtain the recognition sites (Ratautaite et al., 2015). The cTnT and the N-MIP sensor interactions based on Py and COOH-3-Py film is associated to non-covalent interactions, such as hydrogen bonds and electrostatics interactions (Gupta et al., 2013), as have shown in Fig. 1.

The electrochemical stepwise of the N-MIP construction were investigated by CV and DPV techniques, Fig. 4a and b, respectively. The cyclic voltammograms of the RGO modified SPE in Fig. 4a (curve I) showed an increase of redox peaks and reduction in the potential peak-to-peak separation ( $\Delta E$ ) of  $0.25 \text{ V}$  when compared with bare SPE ( $0.34 \text{ V}$ ). It was associated to the high conductivity and excellent electrocatalytic activity of RGO film on SPE surface. After electropolymerization of the Py and cTnT on RGO surface, it was observed an increase of redox peaks in the CV (curve II). The

electroactive area (Bard and Faulkner, 2001) calculated to SPE with the cTnT electropolymerized in the copolymeric matrix was  $0.168 \text{ cm}^2$ . This value exhibits a slight increase when compared with the RGO modified SPE, showing that the conductive copolymer of Py was assembled around the cTnT template and was uniformly deposited onto the nanostructured surface. A decrease of the redox peaks was observed after removal of the cTnT with oxalic acid (curve III). This fact can be attributed to the hydrolysis of the imine and amide bonds formed between the protein template and the copolymer matrix, providing most efficient sites for rebinding of the biomolecule (Shiomi et al., 2005). The rebinding test of the as-prepared N-MIP with cTnT ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) showed a reduction in the peak current. The filling out of the N-MIPs cavities with cTnT blocked the electron transfer on electrode surface (curve IV). The results obtained by DPV in Fig. 4b are in accordance to those obtained with CVs studies. When the N-MIP was regenerated with an oxalic acid solution the redox peaks was returned to its original value, indicating an efficient removal of cTnT in the biomimetic sites (Fig. S2).

### 3.3. Experimental conditions

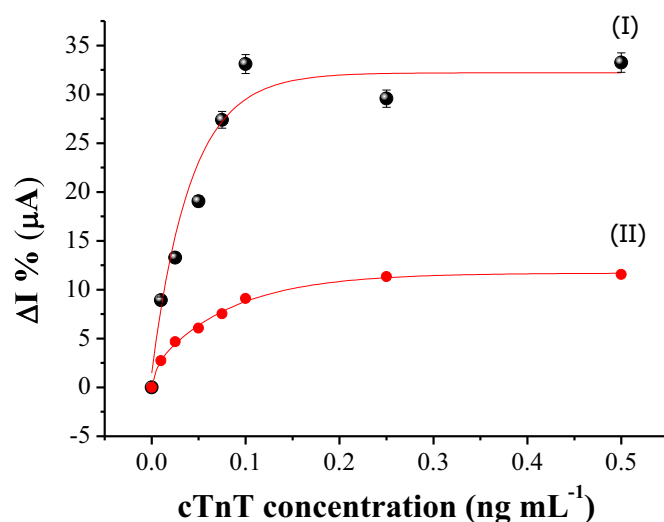
The thickness film is an important factor that affects the recognition ability in N-MIP based on electropolymerization process. It can be affected by electropolymerization parameters such as monomer concentration, cycles of electropolymerization, scan rate and other. Optimal experimental parameters, were established through the  $\Delta I$  value after rebinding with cTnT ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) observed in the CVs. Firstly, the influence of the number of cycles of electropolymerization (5, 10, 20, 30 and 40) of the Py monomers on the N-MIP was evaluated. The results demonstrated a maximal current response at 20 cycles (Fig. S3a). After 30 cycles, the signals showed a decrease. This can be ascribed to the film thickness of the copolymeric matrix that grows up with the number of the cycles and leads to form the film with less accessible printed sites.

A suitable removal of the template in the N-MIP contributes to produce structurally-related template in the polymeric matrix. Herein, the cTnT electropolymerized in the Py copolymer on SPE surface was incubated during 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h with an oxalic acid solution at  $4^\circ\text{C}$  in a moist chamber. The  $\Delta I$  obtained of the CVs measurements reached a plateau at 12 h of the removal time (Fig. S3b). This maximal time may be attributed to complex structures of the cTnT printed in the copolymeric film for removal and form the cTnT imprinted sites.

The optimal incubation time was investigated in order to establish the molecular recognition properties of the N-MIP sensor. The sites at the sensor interface were incubated with cTnT solution ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) during different time (5, 15, 30, 45 and 60 min) at room temperature. The response showed a proportionally increase in the  $\Delta I$  with the incubation time (Fig. S3c). The N-MIP reached a maximal response at 30 min.

### 3.4. Analytical performance of the N-MIP sensor

The analytical performance of the N-MIP and N-NIP sensor was evaluated by submitting different SPEs to specific concentrations of the cTnT diluted in phosphate saline buffer (pH 7.4,  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ), as shown in Fig. 5. The response of the N-MIP sensor was obtained by using the percentual decrease of current ( $\Delta I\%$ ) of the DPVs measurements in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) after incubation with cTnT. N-NIP sensor, without the presence of the cTnT in the copolymeric matrix, was investigated with a control study. The N-MIP sensor (curve I) exhibited a hyperbolic response with a proportional increase of the  $\Delta I\%$  in relation to cTnT concentrations until reached a plateau at  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ . These dates were recorded through of the



**Fig. 5.** Analytical curve of the (curve I) N-MIP and (curve II) N-NIP for different cTnT concentrations ( $0.01$ ;  $0.025$ ;  $0.05$ ;  $0.075$ ;  $0.1$ ;  $0.25$  and  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Measurements performed in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

monitoring of the blocking of the electron transfer at sensor interface due to the rebinding of the cTnT in the printed sites of the N-MIP film. A linear relationship between the  $\Delta I\%$  and cTnT concentrations was obtained in the range from  $0.01$  to  $0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ , which exhibited the following linear regression equation:  $\Delta I\% = 271.45 \cdot C_{\text{cTnT}} + 9.24$ , with a correlation coefficient of  $0.9953$  ( $p < 0.0001$ ,  $n = 5$ ) with a low relative error ( $\ll 1\%$ ).

The electrochemical performance of the N-NIP (curve II) showed a decrease in the  $\Delta I\%$  values when compared to the N-MIP (curve I) response. It is attributed to the lower affinity of the cTnT in the N-NIP film, confirming that the interaction cTnT with Py copolymeric film is controlled by the printed sites. The limit of detection (LOD) of the N-MIP was determined as  $3.3 \text{ RSD}_{\text{blank}}/b$ , where  $\text{RSD}_{\text{blank}}$  is regression residual standard deviation (RSD) of the blank and  $b$  is the slope calculated from analytical curve (Long and Winefordner, 1983). Under conditions, the LOD was estimated to be  $0.006 \text{ ng mL}^{-1}$ . The proposed N-MIP showed a good sensibility for detection of the cTnT with a higher sensitivity than Moreira et al. (2011) by using a carbon-nanotube-MIP. Although Karimian et al. (2013) has reported an ultrasensitive cTnT MIP by employing the poly-*o*-phenylenediamine polymer with similar LOD achieved in this work, their biomimetic sensor consisted of a conventional gold electrode, still requiring progress to become a point-of-care testing. As compared with cTnT immunosensor using cTnT monoclonal antibodies (Dutra et al., 2007; Jacobs et al., 2014; Silva et al., 2013), this N-MIP exhibited a comparable linear range and the LOD ( $0.006 \text{ ng mL}^{-1}$ ) was found in same order of magnitude.

The repeatability of the N-MIP in real samples was performed by replicate measurements of a single electrode in response to the  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$  cTnT. A good repeatability was found with a RSD value of  $3.5\%$  for 10 successive determinations. The N-MIP showed a good reproducibility with a RSD of  $4.1\%$  for ten different sensors after rebinding tests with  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$  cTnT. The long-term stability test of the N-MIP was conducted by measuring the average electrochemical responses of seven sensors, stored in a moist chamber at  $4^\circ\text{C}$ , each day during a week. The current results (Fig. S4), after incubation with cTnT, revealed that  $91.48\%$  of the analytical response was preserved during a week of storage, indicating a good stability.

The binding isotherm predicts the affinity of N-MIPs based on the relationship between the printed sites and the analyte

concentration generated of equilibrium rebinding studies. Herein, Langmuir isotherm was used as a model to calculate the  $K_D$ , a dissociation constant based on concentration of template providing half of the maximum response of the N-MIP response (Moreira et al., 2014). According to the model, the  $K_D$  of the N-MIP and N-NIP sensor was  $7.3 \cdot 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$  and  $11.6 \cdot 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. The  $K_D$  calculated of the N-MIP was 40% lower when compared as N-NIP, reflecting a high affinity of the biomimetic sites to low cTnT concentrations. The constant of the N-MIP is comparable to that of conventional antibodies that exhibits  $K_D$  in the range of  $10^{-7}$ – $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  (Chen et al., 2014).

### 3.5. Determination of the cTnT in serum samples

Serum samples of infarcted patients were analyzed to evaluate the performance of the N-MIP sensor. The amount of cTnT in the serum samples was previously measured by a Roche Elecsys 2010 Immunoassay Analyzer (Roche Diagnostics) that is based on the ECLIA method. The assays were carried out in triplicate by incubation of the N-MIP sensor during 30 min with different serum samples diluted in phosphate buffer saline solution ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4). The relationship between the  $\Delta I\%$  values obtained of DPV measurements and the cTnT serum concentrations can be analyzed in Fig. 6a. The linear regression equation for analytical response of the N-MIP for serum samples was  $\Delta I\% =$

**Table 1**

Recovery values for cTnT concentrations ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) in serum samples measured by the N-MIP sensor and gold-standard method (ECLIA assay).

| ECLIA method | N-MIP sensor | Recovery (%) |
|--------------|--------------|--------------|
| 0.017        | 0.021        | 115          |
| 0.035        | 0.039        | 111          |
| 0.072        | 0.079        | 109          |
| 0.141        | 0.157        | 111          |
| 0.280        | 0.271        | 97           |

$202 \cdot C_{\text{cTnT}} + 0.609$  ( $r=0.993$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n=5$ ). A proportional decrease in the peak current of the DPVs with cTnT concentrations in real samples was obtained (Fig. 6a, inset). This suppression of the response in the voltammograms can be ascribed to the specific binding of analyte in the sites of the N-MIP. The accuracy of N-MIP in relation to the ECLIA method was evaluated by performing analytical recovery experiments. The recoveries were in the range from 96% to 115% (Table 1 – Supplementary data). According to Student *t*-test, the methods are similar at a 95% confidence level, showing that good correlation with the ECLIA method and the accuracy of the N-MIP sensor, with an average error of approximately 10%.

The selectivity of the N-MIP was tested from a complex matrix of a pool of sera. The pool was obtained by mixing 10 sera, in which a part thereof has been spiked to a concentration of  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$  cTnT. The analytical responses to cTnT were performed against the serial dilutions of the samples for both, the spiked and control sera. According to Fig. 6b, it was still possible to observe significant differences between positive samples (curve I) and negative (curve II) up to the fourth serial dilution, at 1/100 dilution as highlighted by arrow, corresponding to the concentration of  $0.005 \text{ ng mL}^{-1}$  cTnT. This value is consistent with the LOD obtained, showing that the proposed N-MIP has capacity to differentiate the cTnT in complex matrices of serum samples being adequate to a point-of-care testing for AMI.

## 4. Conclusions

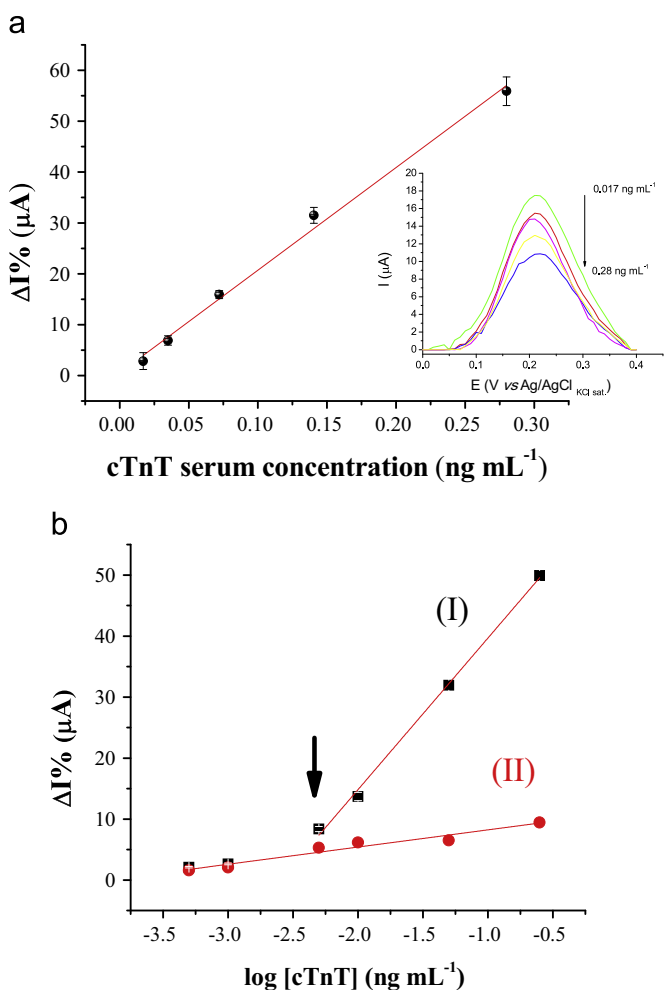
A conductive N-MIP by direct electropolymerization of cTnT biomimetic on the electrode surface was successfully developed. The RGO on the SPE was strategically explored to form more porous and larger surface allowing N-MIPs 3D structures, and improving the sensitivity. Additionally, the use of organic and conducting polymers seems to be a contributing factor to increase the performance. It was found a binding constant similar to those obtained from natural biomolecules. Finally, it was developed a biomimetic sensor integrating a low cost and practical technology of the SPE with a high stability, and powerful for AMI detection.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq/Brazil) and FACEPE/Brazil, the Pernambuco state research foundations. Bárbara V.M. Silva thanks to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil foundation, for the scholarship during this work.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.068>.

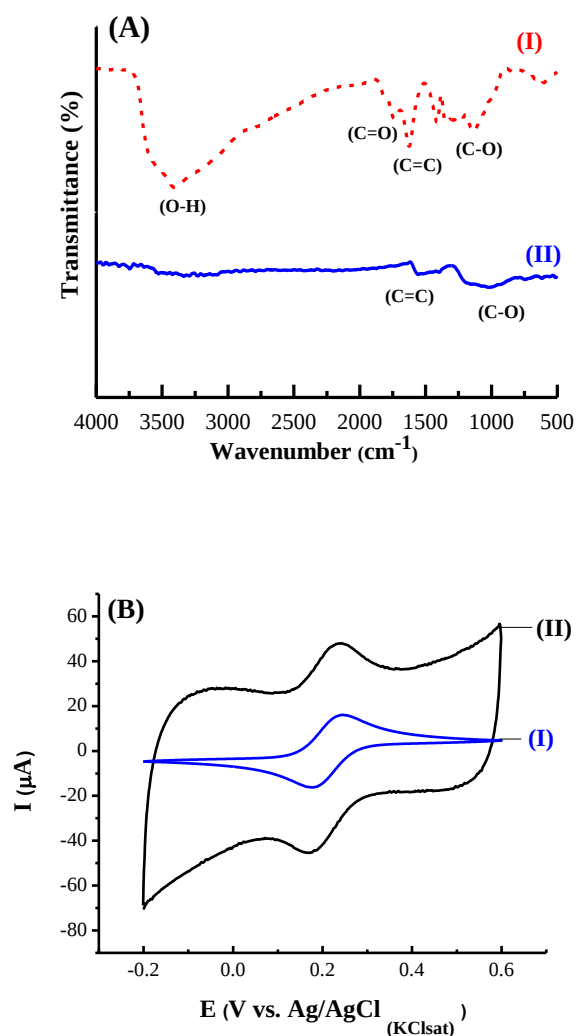


**Fig. 6.** (a) N-MIP response for cTnT concentration in serum samples (inset: DPVs of the N-MIP sensor in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ )) and (b) influence of the matrix effect over N-MIP sensor for a pool of sera of (curve I) myocardial infarcted and (curve II) non-myocardial infarcted subjects. Error bars represent the standard deviations for three replicates.

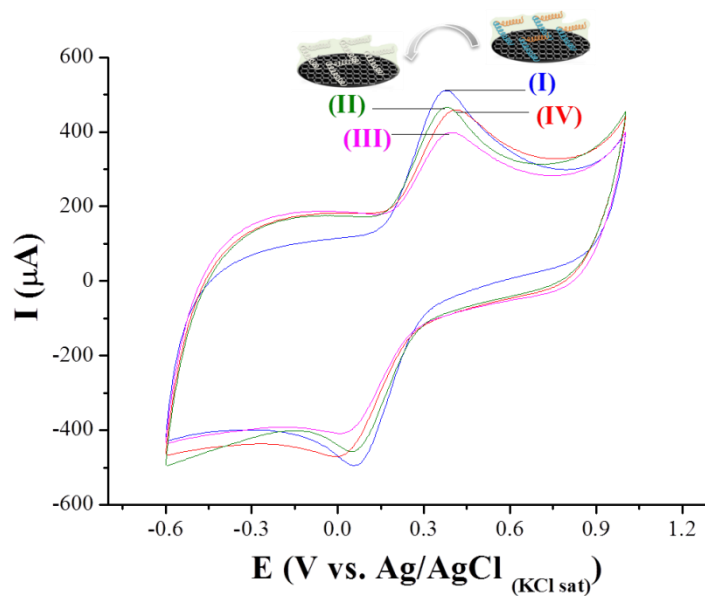
## References

- Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Matos, P., Arcos-Martínez, M.J., 2010. *Anal. Chim. Acta.* 665 (1), 26–31.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, New York.
- Cabral-Miranda, G., Gidlund, M., Sales, M.G.F., 2014. *J. Mater. Chem. B* 2, 3087–3095.
- Calvo, A.S., Botas, C., Martín-Yerga, D., Álvarez, P., Menéndez, R., Costa-García, A., 2015. *J. Electrochem. Soc.* 162 (10), B282–B290.
- Chen, H., Kong, J., Yuan, D., Fu, G., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 53, 5–11.
- Cinti, S., Arduini, F., Carbone, M., Sansone, L., Cacciotti, I., Moscone, D., Pallechi, G., 2015. *Electroanal.* 27, 2230–2238.
- Coates, J., 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 10815–10837.
- Cui, Z., Guo, C.X., Yuan, W., Li, C.M., 2012. *Phys. Chem.* 14, 12823–12828.
- Ding, X., Heiden, P.A., 2014. *Macromol. Mater. Eng.* 299, 268–282.
- Dutra, R.F., Mendes, R.K., Lins da Silva, V., Kubota, L.T., 2007. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1744–1750.
- Granado, V.L.V., Gutiérrez-Capitán, M., Fernández-Sánchez, C., Gomes, M.T.S.R., Rudnitskaya, A., Jimenez-Jorquera, C., 2014. *Anal. Chim. Acta.* 809, 141–147.
- Gupta, V.K., Yola, M.L., Öztalın, N., Atar, N., Üstündağ, Z., Uzun, L., 2013. *Electrochim. Acta* 112, 37–43.
- Hong, C.-C., Chen, C.-P., Horng, J.-C., Chen, S.-Y., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 50, 425–430.
- Hummer Jr., W.S., Offerman, R.E., 1958. *J. Am. Chem. Soc.* 80 (6) 1339–1339.
- Huynh, T.P., Pietrzyk-Le, A., K.C., C. Bikram, Noworyta, K.R., Sobczak, J.W., Sharma, P. S., D'Souza, F., Kutner, W., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 41, 634–641.
- Jacobs, M., Panneer Selvam, a, Craven, J.E., Prasad, S., 2014. *J. Lab. Autom.* 19, 546–554.
- Janmanee, R., Baba, A., Phanichphant, S., Sriwichai, S., Shinbo, K., Kato, K., Kaneko, F., 2012. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 4270–4275.
- Karimian, N., Vagin, M., Zavar, M.H.A., Chamsaz, M., Turner, A.P.F., Tiwari, A., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 50, 492–498.
- Kim, J.M., Yang, L.C., Park, J.Y., 2015. *Sens. Actuators B -Chem.* 206, 50–55.
- Long, G.L., Winefordner, J.D., 1983. *Anal. Chem.* 55, 713A–724A.
- Moreira, F.T.C., Dutra, R.A.F., Noronha, J.P.C., Cunha, A.L., Sales, M.G.F., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 28, 243–250.
- Moreira, F.T.C., Sharma, S., Dutra, R.A.F., Noronha, J.P.C., Cass, A.E.G., Sales, M.G.F., 2014. *Sens. Actuators B -Chem.* 196, 123–132.
- Nezhadali, A., Pirayesh, S., Shadmehri, R., 2013. *Sens. Actuators B -Chem.* 185, 17–23.
- Prasad, B.B., Pandey, I., Srivastava, A., Kumar, D., Tiwari, M.P., 2013. *Sens. Actuators B -Chem.* 176, 863–874.
- Ratautaite, V., Plausinaitis, D., Baleviciute, I., Mikoliunaite, L., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., 2015. *Sens. Actuators B -Chem.* 212, 63–71.
- Rossetti, C., Qader, A.A., 2014. *Anal. Chem.* 86, 12291–12298.
- Sato, J., Takasu, Y., Fukuda, K., Sugimoto, W., 2011. *Chem. Lett.* 40 (1), 44–45.
- Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K., 2005. *Biomaterials* 26, 5564–5571.
- Silva, B.V.M., Cavalcanti, I.T., Silva, M.M.S., Dutra, R.F., 2013. *Talanta* 117, 431–437.
- Soleimani, M., Afshar, M.G., Shafaat, A., Crespo, G.A., 2013. *Electroanal.* 25, 1159–1168.
- Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., 2012. *Circulation* 126, 2020–2035.
- Tighilt, F.-Z., Subramanian, P., Belhaneche-Bensemra, N., Boukherroub, R., Gabouze, N., Sam, S., Szunerits, S., 2011. *Analyst* 136, 4211–4216.
- Xue, C., Wang, X., Zhu, W., Han, Q., Zhu, C., Hong, J., Zhou, X., Jiang, H., 2014. *Sens. Actuators B -Chem.* 196, 57–63.

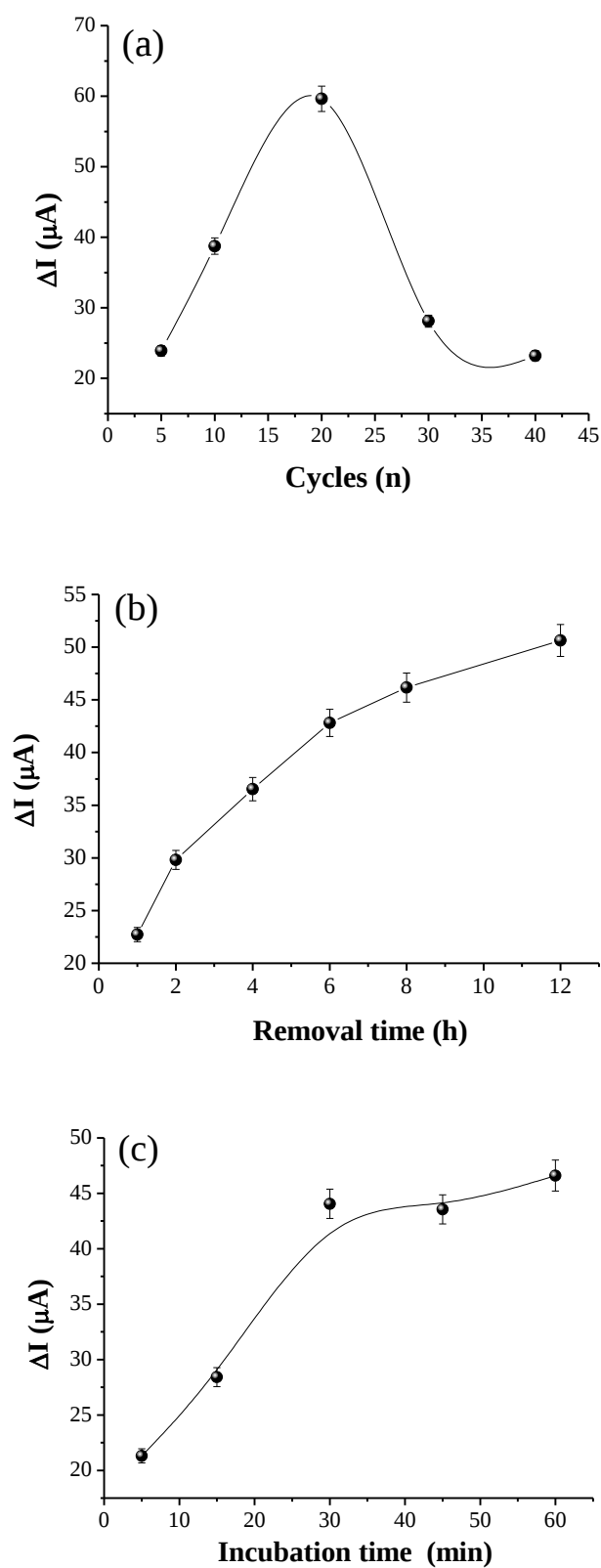
## Supplementary data



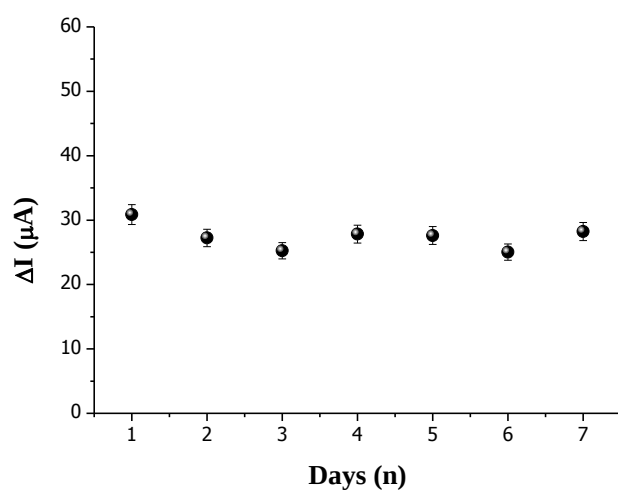
**Figure S1.** (A) FTIR spectra of the GO (curve I) and RGO (curve II); (B) Cyclic voltammograms of the electrode modified with GO (curve I) and RGO (curve II). Measurements performed in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).



**Figure S2.** Cyclic voltammograms of the regeneration study the N-MIP: N-MIP (curve I), after cTnT removal; rebinding with cTnT ( $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and regeneration with oxalic acid solution ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ). Measurements performed in in  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) prepared in  $\text{KCl}$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ).



**Figure S3.** Optimization of experimental conditions of the N-MIP sensor: (a) cycles of electropolymerization, (b) removal time of the cTnT and (c) incubation time of the cTnT.  $\Delta I$  values obtained of CVs in  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution prepared in  $KCl$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).



**Figure S4.** Electrochemical stability of the response of the N-MIP for cTnT (0.5 ng mL<sup>-1</sup>) measured during a week.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sensores impressos constituem uma das alternativas mais atrativas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. Dentre as vantagens, a versatilidade em modificar a matriz de impressão com tintas, nanomateriais, mediadores químicos, dentre outros, foi bastante explorada nesta Tese. Percebe-se que a presença de nanomateriais de carbono, especialmente CNTs e GR, contribuiu para melhoria global dos sensores produzidos, incluindo aumento da transferência elétrica, da relação superfície/volume, da densidade de moléculas imobilizadas e, por fim, indução de propriedades catalíticas.

A incorporação dos CNTs à tinta de carbono na confecção dos eletrodos imprimiu a possibilidade de se construir uma plataforma sensora em uma única etapa, facilitando o escalonamento da produção de imunossensores com elevada reprodutibilidade ( $DP < 2\%$ ). Os grupos funcionais dos CNTs na superfície do filme impresso foram utilizados para imobilização orientada dos anticorpos anti-cTnT, dispensando o uso de reagentes funcionais ou polímeros ligantes no processo de imobilização. Ao final, o imunossensor apresentou sensibilidade para detecção da cTnT, com menor limite de detecção ( $0,0035 \text{ ng/mL}$ ), em amostras em tampão e soro, ainda reportado. Portanto, o método proposto representa um avanço no desenvolvimento de sensores nanoestruturados, constituindo-se numa ferramenta analítica, portátil e de mono uso para o diagnóstico do AMI.

A tentativa de substituição dos anticorpos no intuito de reduzir os custos da plataforma sensora, visto que estes representam uma parcela significativa do custo de um sensor, foi realizada com sucesso principalmente devido ao sinergismo obtido pela alta área superficial do GR e associado às vantagens do uso de um polímero condutor (PPy/PPy-COOH) na construção da matriz biomimética. Além disso, a escolha de polímeros orgânicos condutores contendo grupos reativos ( $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ , etc) permitiu mimetizar mais facilmente a estrutura das proteínas, particularmente porções terminais de anticorpos. Ao contrário das técnicas usuais de produção de sistemas biomiméticos (“in bulk”), a impressão em superfície reúne diversas vantagens, como aproveitamento maior do material a se biomimetizado, diminuição das etapas de procedimento, independência de materiais eletródicos específicos e obtenção direta de filmes com espessuras controladas sobre superfícies sensoras, utilizando o simples procedimento de polimerização eletroquímica. O sistema biomimético produzido para detecção da cTnT, nas condições estudadas, apresentou uma boa especificidade ( $K_D = 7,3 \cdot 10^{-13} \text{ mol/L}$ ), sendo esta duas vezes superior ao controle, podendo ser explorado para aplicação em

triagens de emergências cardíológicas e representando uma tendência na relação custo-eficiência em sensores.

Por fim, as plataformas desenvolvidas nesta Tese, comparadas às da literatura, mostraram-se eficazes em detectar a cTnT em níveis clínicos e de importância para o diagnóstico do infarto agudo. A adaptação da detecção eletroquímica amperométrica para um sistema livre de marcação pela técnica de pulso diferencial constitui novos avanços no desenvolvimento de testes rápidos (à beira do leito), mais práticos e econômicos para diagnóstico de doenças de alta mortalidade.

## 6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560 p.

ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A. Overview of optical biosensing techniques. In: MARKS, R. S.; LOWE, C. R.; CULLEN, D. C.; WEETALL, H. H.; KARUBE, I. **Handbook of Biosensors and Biochips**. Wiley, Weinheim, 2007.

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

ALBERT, S.; ALBERT, K. K.; QUACK, M. **High-Resolution Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. Handbook of High-resolution Spectroscopy. New York: Ed. Wiley, 2011.

ALDOUS, S. J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, 164, 282–294, 2013.

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

ALTINTAS, Z.; FAKANYA, W. M.; TOTHILL, I. E. Cardiovascular disease detection using bio-sensing techniques. **Talanta**, 128, 177-186, 2014.

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

ARUGULA, M. A.; SIMONIAN, A. Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives. **Measurement Science and Technology**, 25, 1-22, 2014.

APPLE, F. S.; MURAKAMI, M. M. Cardiac troponin and creatine kinase MB monitoring during in-hospital myocardial reinfarction. **Clinical Chemistry**, 51, 460-463, 2005.

APPLE, F. S.; SMITH, S. W.; PEARCE, L. A.; MURAKAMI, M. M. Assessment of the multiple-biomarker approach for diagnosis of myocardial infarction in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. **Clinical Chemistry**, 55, 93-100, 2009.

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

BARD, J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Ed. Wiley, 2001. 864 p.

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

BERTÓK, T.; KATRLÍK, J.; GEMEINER, P.; TKAC, J. Electrochemical lectin based biosensors as a label free tool in glycomics. **Microchemical Acta**, 180, 1-13, 2013.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. 1<sup>a</sup> ed. New York: Ed. Oxford University Press, 1993. 464 p.

BUFFLE, J.; TEECIER-WAEBER, M.-L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trends in Analytical Chemistry**, 24, 172-191, 2005.

CABRAL-MIRANDA, G.; GIDLUND, M.; SALES, M. G. F. Backside-surface imprinting as a new strategy to generate specific plastic antibody materials. **Journal of Materials Chemistry B**, 2, 3087-3095, 2014.

CHAN, D.; NG, L. L. Biomarkers in acute myocardial infarction. **BMC Medicine**, 8, 2-11, 2010.

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

CHEN, H.; KONG, J.; YUAN, D.; FU, G. Synthesis of surface molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme using a metal coordination monomer. **Biosensor and Bioelectronics**, 53, 5-11, 2014.

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

CHUA, J. H.; CHEE, R. E.; AGARWAL, A.; WONG, S. M.; ZHANG, G. J. Label-free electrical detection of cardiac biomarker with complementary metal-oxide semiconductor-compatible silicon nanowire sensor arrays. **Analytical Chemistry**, 81, 6266-6271, 2009.

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

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, 27, 970-979, 2004.

DAS, I.; AGRAWAL, N. R.; GUPTA, S. K.; GUPTA, S. K.; RASTOGI, R. P. Fractal growth kinetics and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole. **Journal of Physical Chemistry A**, 113 (18), 5296-5301, 2009.

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

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: Ed. EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DIAS, R. R.; MEJIA, O. A. V. M.; FERNANDES, F.; RAMIRES, F. J. A.; MADY, C.; STOLF, N. A. G.; JATENE, F. B. Impacto da mortalidade da doença da aorta torácica no estado de São Paulo no período de 1998 a 2007. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 101 (6), 528-535, 2013.

DING, X.; HEIDEN, P. A. Recent developments in molecularly imprinted nanoparticles by surface imprinting techniques. **Macromolecular Materials and Engineering**, 299, 268–282, 2014.

DOLCI, A.; PANTEGHINI, M. The exciting story of cardiac biomarkers: From retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. **Clinica Chimica Acta**, 369 (2), 179–187, 2006.

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. **Clinical Chimica Acta**, 376, 114-120, 2007.

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

ERICSSON, E. **Biosensor surface chemistry for oriented protein immobilization and biochip patterning**.<sup>1ª</sup> ed. Suécia: Linköping University, 2013. 64 p.

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

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; BARCELO, D. Advances in immunochemical, technologies for analysis of organic pollutants in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 1100-12, 2007.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Química Nova**, 29 (1), 137-142, 2006.

FORATO, L. A.; FILHO, R. B.; OSIRO, D.; BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. Espectroscopia na região do infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa instrumentação agropecuária**, 1-14, 2010.

FORD, E. S.; AJANI, U. A.; CROFT, J. B.; CRITCHLEY, J. A.; LAGARTHE, D. R.; KOTTKE, T. E.; GILES, W. H.; CAPEWELL, S. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980 - 2000. **The New England Journal of Medicine**, 356, 2388-2398, 2007.

GAO, C.; GUO, Z.; LIUA, J. H.; HUANG, X.-J. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, 4, 1948-63, 2012.

GAO, H.; DUAN, H. 2D and 3D graphene materials: preparation and bioelectrochemical applications. **Biosensors and bioelectronics**, 65, 404-419, 2015.

GE, X.; ASIRI, A. M.; DU, D.; WEN, W.; WANG, S.; LIN, Y. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, 58, 31-39, 2014.

GODET, G.; BERNARD, M.; BEN AYED, S. Cardiac biomarkers for diagnosis of myocardial infarction. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, 28, 321-331, 2009.

GOMES-FILHO, S. L. R.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, M. M. S.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponina T. **Microchemical Journal**, 109, 10-15, 2013.

GOPINATH, S. C. B.; TANG, T.-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 57, 292-302, 2014.

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

GRANADO, V. L. V.; GUTIÉRREZ-CAPITÁN, M.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; GOMES, M. T. S. R.; RUDNITSKAYA, A.; JIMENEZ-JORQUERA, C. Thin-film electrochemical sensor for diphenylamine detection using molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, 809, 141-147, 2014.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, 8, 1400-1458, 2008.

GRIFFITHS, P.; HASETH, J. A. D. **Fourier Transform Infrared Spectrometry**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Ed. Wiley, 2007. 560 p.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHIMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, 32 (8-9), 876-921, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1152 p.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2005. 876 p.

HENRY, O. Y. F.; PILETSKY, S. A.; CULLEN, D. C. Fabrication of molecularly imprinted polymer microarray on a chip by mid-infrared laser pulse initiated polymerisation. **Biosensors & Bioelectronics**, 23 (12), 1769-1775, 2008.

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

HUYNH, T.-P.; KUTNER, W. Molecularly imprinted polymers as recognition materials for electronic tongues. **Biosensor and Bioelectronics**, 74, 856-864, 2015.

HUYNH, T.-P.; PIETRZYK-LE, A.; BIKRAM K. C. C.; NOWORYTA, K. R.; SOBCZAK, J. W.; SHARMA, P. S.; D'SOUZA, F.; KUTNER, W. Electrochemically synthesized molecularly imprinted polymer of thiophene derivatives for flow-injection analysis determination of adenosine-5'-triphosphate. **Biosensors and Bioelectronics**, 41, 634-641, 2013.

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

IRSHAD, M.; IQBAL, N.; MUJAHID, A.; AFZAL, A.; HUSSAIN, T.; SHARIF, A.; AHMAD, E.; ATHAR, M. M. Molecularly imprinted nanomaterials for sensor applications. **Nanomaterials**, 3, 615-637, 2013.

JACOBS, M.; SELVAM, A. P.; CRAVEN, J. E.; PRASAD, S. Antibody-conjugated gold nanoparticles-based immunosensor for ultra-sensitive detection of troponin T. **Journal of Laboratory Automation**, 19 (6), 546-554, 2014.

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

JAROLIM, P. Overview of Cardiac Markers in Heart Disease Review Article. **Clinics in Laboratory Medicine**, 34 (1), 1-14, 2014.

JIANG, J.; KUCERNAK, A. Nanostructured platinum as an electrocatalyst for the electrooxidation of formic acid. **Journal Electroanalytical Chemistry**, 520 (1-2), 64-70, 2002.

JOUKAR, S.; NAJAFIPOUR, H.; DABIRI, H.; SHEIBANI, M.; SHAROKHI, N. Cardioprotective Effect of Mumie (Shilajit) on Experimentally Induced Myocardial Injury. **Cardiovascular Toxicology**, 14 (3), 214-221, 2014.

JUNG, Y.; JEONG, J. Y.; CHUNG, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. **Analyst**, 133, 697-701, 2008.

KARMEN, A.; WROBLEWSKI, F.; LA DUE, J. S. Transaminase activity in human blood. **Journal of Clinical Investigation**, 34, 126–133, 1954.

KARIMIAN, N.; TURNER, A. P. F.; TIWARI, A. Electrochemical evaluation of troponin T imprinted polymer receptor. **Biosensor and Bioelectronics**, 59, 160-165, 2014.

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

KATZ, E.; ALFONTA, L.; WILLNER, I. Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as methods for signal transduction in immunosensors. **Sensors & Actuators, B: Chemical**, 76, 134-141, 2001.

KIM, J. M.; YANG, L. C.; PARK, J. Y. Quartz crystal microbalance (QCM) gravimetric sensing of theophylline via molecularly imprinted microporous polypyrrole copolymers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 206, 50–55, 2015.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, 84 (2), 685–707, 2012.

KRYSCIO, D. R.; PEPPAS, N. A. Critical review perspective of macromolecularly imprinted polymers. **Acta Biomaterialia**, 8 (2), 461-473, 2012.

KURZ, M. C.; MATTU, A.; BRADY, W. J. Acute Coronary Syndrome. In: MARX, J.; HOCKBERGER, R.; WALLS, R. **Rosen's Emergency Medicine - Concepts and Clinical Practice**. 8<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2014. vol. 3, cap. 78.

LARKIN, P. **Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation**. 1<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Ed. Elsevier, 2011. 535 p.

LEMOS, J. A. Increasingly Sensitive Assays for Cardiac Troponins. **Journal of the American Medical Association**, 309 (21), 2262-2269, 2013.

LI, L.; LU, Y.; BIE, Z. J.; CHEN, H. Y.; LIU, Z. Photolithographic Boronate Affinity Molecular Imprinting: A General and Facile Approach for Glycoprotein Imprinting. **Angewandte Chemie International Edition**, 52 (29), 7451–7454, 2013.

LI, M.; LI, Y.-T.; LI, D.-W.; LONG, Y.-T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays - A review. **Analytical Chimica Acta**, 734, 31-44, 2012.

LIBBY, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. **New England Journal of Medicine**, 368, 2004-2013, 2013.

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

LORENZO, R. A.; CARRO, A. M.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymer (MIPs). **International Journal of Molecular Sciences**, 12, 4327-4347, 2011.

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

LUQUE, M. D. C.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, 1217, 2383–2389, 2010.

LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. **Nanomaterials for biosensor and implantable biodevices**. In: CRESPILO, F. N. Nanobioelectrochemistry: From Implantable

Biosensors to Green Power Generation. 1<sup>a</sup> ed. Berlim: Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. p. 27-48.

MAGEE, R. F.; LACERDA, E. C. T.; BORGES, G. F. B.; DAHER, G. A. G.; MACEDO, R. G.; NOGUEIRA, A. C. C.; BRICK, A. V. Síndrome Coronariana Aguda: uma revisão. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, 1 (3), 174-189, 2012.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction—An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. **Pharmacognosy Reviews**, 1, 7–18, 2007.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 99 (2), 755-761, 2012.

MARESTONI, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SEGATELLI, M. G.; SARTORI, L. R.; TARLEY, C. R. T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparação e aplicações em química analítica. **Química Nova**, 36 (8), 1194-1207, 2013.

**MARKETS AND MARKETS.** Biosensors Market by Application (Point of Care, Home Diagnostics, Research Labs, Biodefense, Environmental Monitoring, Food Industry), Product (Wearable, Non-Wearable), Technology (Electrochemical, Piezoelectric, Optical) & Geography - Analysis & Forecast to 2020. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosensors-market-798.html>. Acesso em: 22 de dezembro de 2015.

MARTÍNEZ-PAREDES, G.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; COSTA-GARCÍA, A. In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition. **Electrochimica Acta**, 54, 4801–4808, 2009.

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

MCDONNELL, B.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R. Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing. **Clinical Biochemistry**, 42, 549-561, 2009.

MENDIS, S.; THYGESEN, K.; KUULASMAA, K.; GIAMPAOLI, S.; MAHONEN, M.; NGU BLACKETT, K.; LISHENG, L. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. **International Journal Epidemiology**, 40, 139-146, 2011.

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

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensor based on screen-printed electrodes. **Analyst**, 139, 2289-2311, 2014.

MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; CUNHA, A. L.; SALES, M. G. F. Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. **Biosensor and Bioelectronics**, 28, 243-250, 2011.

MOREIRA, F. T. C.; SHARMAD, S.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; CASS, A. E. G.; SALES, M. G. F. Protein-responsive polymers for point-of-care detection of cardiac biomarker. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 196, 123–132, 2014.

MORITA, S.; WIESENDANGER, R.; MEYER, E. **Noncontact atomic force microscopy**. Berlin: Ed. Springer, 2002. 439 p.

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

MOTTA, N. A. V.; FUMIAN, M. M.; CASTRO, J. P.; BRITO, F. C. F. Inflamação e Aterosclerose: Novos Biomarcadores e Perspectivas Terapêuticas. **Revista Brasileira de Cardiologia**, 26 (5), 390-399, 2013.

MUELLER, M.; VAFAIE, M.; BIENER, M.; GIANNITSIS, E.; KATUS, H. A. Cardiac Troponin T – From Diagnosis of Myocardial Infarction to Cardiovascular Risk Prediction. **Circulation Journal**, 77, 1653-1661, 2013.

MUJAHIND, A.; IQBAL, N.; AFZAL, A. Bioimprinting strategies: From soft lithography to biomimetic sensor and beyond. **Biotechnology Advances**, 31 (8), 1435-1447, 2013.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Química Nova**, 21 (5), 614-629, 1998.

NEZHADALI, A.; PIRAYESH, S.; SHADMEHRI, R. Computer-assisted sensor design and analysis of 2-aminobenzimidazole in biological model samples based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 185, 17–23, 2013.

NICOLAU, J. C.; TIMERMAN, A.; MARIN-NETO, J. A.; PIEGAS, L. S.; BARBOSA, C. J. D. G.; FRANCI, A.; AVEZUM JR., A.; CARVALHO, A. C. C.; MARKMAN FILHO, B.; POLANCZYK, C. A.; ROCHITTE, C. E.; SERRANO JÚNIOR, C. V.; PRECOMA, D. B.; SILVA JUNIOR, D. G.; ALBUQUERQUE, D. C.; STEFANINI, E.; KNOBEL, E.; JATENE, F. B.; FERES, F.; MORCERF, F. A. P.; GANEM, F.; LIMA FILHO, F. A.; FEITOSA FILHO, G. S.; FERREIRA, J. F. M.; MENEGHETTI, J. C.; SARAIVA, J. F. K.; SILVA, L. S.; MAIA, L. N.; BARACIOLI, L. M.; LISBOA, L. A. F.; DALLAN, L. A. O.; BODANESE, L. C.; ANDRADE, M. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, M.; DUTRA, O. P.; COELHO, O. R.; LEÃES, P. E.; ALBUQUERQUE, P. F.; LEMOS, P.; KALIL, R.; COSTA, R. V. C.; ESPORCATE, R.; MARINO, R. L.; BOTELLHO, R. V.; MENEGHELO, R. S.; SPROVIERI, S. R.; TIMERMAN, S.; MATHIAS JÚNIOR, W. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST (II Edição, 2007) – Atualização 2013/2014. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 102 (3), 1-61, 2014.

NIGAN, P. K. Biochemical markers of myocardial injury. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 22 (1), 10-17, 2007.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, 306 (5696), 666–669, 2004.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, 5 (4), 516-537, 2013.

PAQUIM, A. M.; BRETT, A. M. Microscopia de Força Atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, 57-68, 2009.

**PERKINELMER**. FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Technical Note (2005). Disponível em: <[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)>. Acesso em: 25 abril 2015.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, 12, 1-15, 2014.

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

PESAVENTO, M.; D'AGOSTINO, G.; BIESUZ, R.; ALBERTI, G. Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for Amperometric Determination of Nonelectroactive Substances. **Electroanalysis**, 21(3-5), 604-611, 2009.

PIAO, M.-H.; OH, H.-B.; RAHMAN, M. A.; WON, M.-S.; SHIM, Y.-B. Label-Free Detection of Bisphenol A Using a Potentiometric Immunosensor. **Electroanalysis**, 20, 30-37, 2008.

PIEGAS, L. S.; AVEZUM, A.; GUIMARÃES, H. P.; MUNIZ, A. J.; REIS, H. J. L.; SANTOS, E. S.; KNOBEL, M.; SOUZA, R. Comportamento da síndrome coronariana aguda. Resultado de um registro brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 100 (6), 502-510, 2013.

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

PRASAD, B. B.; PANDEY, I.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, D.; TIWARI, M. P. Multiwalled carbon nanotubes-based pencil graphite electrode modified with an electrosynthesized molecularly imprinted nanofilm for electrochemical sensing of methionine enantiomers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 176, 863–874, 2013.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors—A review. **Electrochimica Acta**, 55, 4227–4233, 2010.

RABA, J.; FERNÁNDEZ-BALDO, M. A.; PEREIRA, S. V.; MESSINA, G. A.; BERTOLINO, F. A.; TOSETTI, S.; FERRAMOLA, M. I. S. **Analytical biosensors for the pathogenic microorganisms determination**. In: MÉNDEZ-VILAS, A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Ed. FORMATEX, 2013. p. 227-238.

RAMASAMY, I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. **Clinica Chimica Acta**, 412, 1279-1296, 2011.

RANDLES, J. E. B.; A cathode ray polarograph .2. The current-voltage curves. **Transactions of the Faraday Society**, 44 (5), 327-&, 1948.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 398, 2403-2412, 2010.

REDEKER, E. S.; TA, D. T.; CORTENS, D.; BILLEN, B.; GUEDENS, W.; ADRIAENSENS, P. Protein engineering for direct immobilization. **Bioconjugate Chemistry**, 24, 1761-1777, 2013.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, 605, 111-129, 2007.

ROSALKI, S. B. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 69 (4), 696–705, 1967.

RUFF, C. T; BRAUNWALD, E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. **Nature Reviews Cardiology**, 8, 140-147, 2011.

SCHIRHAGL, R.; REN, K. N.; ZARE, R. N. Surface-imprinted polymers in microfluidic devices. **Science China Chemistry**, 55 (4), 469-483, 2012.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. A method for high efficiency of water-soluble carbodiimide mediated amidation. **Analytical Biochemistry**, 218, 87-91, 1994.

SHARMA, P. S; PIETRZYK-LE, A.; D'SOUZA, F.; KUTNER, W. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 402 (10), 3177-3204, 2012.

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

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2000. 460 p.

SINGH, M.; KATHUROJU, P. K.; JAMPANA, N. Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 143 (1), 430-443, 2009.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2008. 999 p.

SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. New York: CRC Press, 1998. 256 p.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Aspectos teóricos. **Química Nova**, 1, 81–89, 2003.

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

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensor: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14, 4, 159-173, 2003.

SVENSON, J. Ultrasound-assisted preparation of molecularly imprinted polymers: Effects on polymer morphology, binding, and chromatographic behavior. **Analytical Letters**, 39, 2749–2760, 2006.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1<sup>a</sup> ed. Hoboken: Ed. Wiley, 2005. 244p.

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrode for biosensing: a review (2008-20013). **Microchimica Acta**, 181, 865-891, 2014.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP. **Química Nova**, 28 (6), 1076-1086, 2005.

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

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; JAFFE, A. S.; SIMOONS, M. L.; CHAITMAN, B. R.; WHITE, H. D. Third universal definition of myocardial infarction. **Circulation**, 126 (16), 2020–2035, 2012.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. Universal definition of myocardial infarction. **European Heart Journal**, 28, 2525-2538, 2007.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D.; JAFFE, A. S.; KATUS, H. A.; APPLE, F. S.; LINDAHL, B.; MORROW, D. A.; CHAITMAN, B. R.; CLEMMENSEN, P. M.; JOHANSON, P.; HOD, H.; UNDERWOOD, R.; BAX, J. J.; BONOW, R. O.; PINTO, F.; GIBBONS, R. J.; FOX, K. A.; ATAR, D.; NEWBY, L. K.; GALVANI, M.; HAMM, C. W.; URETSKY, B. F.; STEG, G.; WIJNS, W.; BASSAND, J.-P.; MENASCHE, P.; RAVKILDE, J.; OHMAN, E. M.; ANTMAN, E. M.; WALLENTIN, L. C.; ARMSTRONG, P. W.; SIMOONS, M. L.; JANUZZI, J. L.; NIEMINEN, M. S.; GHEORGHIAD, M.; FILIPPATOS, G.; LUEPKER, R. V.; FORTMANN, S. P.; ROSAMOND, W. D.; LEVY, D.; WOOD, D.; SMITH, S. C.; HU, D.; LOPEZ-SENDON, J.-L.; ROBERTSON, R. M.; WEAVER, D.; TENDERA, M.; BOVE, A. A.; PARKHOMENKO, A. N.; VASILIEVA, E. J.; MENDIS, S. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. **Journal American College of Cardiology**, 60 (16), 1581–1598, 2012<sub>b</sub>.

TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, **138**, 1619-1627, 2013.

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

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

VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites. **Carbon**, 84, 519-550, 2015.

VOLKERT, A. A.; HAES, A. J. Advancements in nanosensors using plastic antibodies. **Analyst**, 139, 21-31, 2014.

WEI, B.; JIN, J.-P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 505 (2), 144-154, 2011.

**WHO.** Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso: 02 de abril de 2015<sub>a</sub>.

**WHO.** The Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_13\\_coronaryHD.pdf?ua=1](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_13_coronaryHD.pdf?ua=1). Acesso: 02 de abril de 2015<sub>b</sub>.

WONG-Ek, K.; CHAILAPAKUL, O.; NUNTAWONG, N.; JARUWONGRUNGSEE, K.; TUANTRANONT, A. Cardiac troponin T detection using polymers coated quartz crystal microbalance as a cost-effective immunosensor. **Biomedizinische Technik F(Berl)**, 55, 279-284, 2010.

WROBLEWSKI, F.; LA DUE, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 90, 210–213, 1955.

XUE, C.; WANG, X.; ZHU, W.; HAN, Q.; ZHU, C.; HONG, J.; ZHOU, X.; JIANG, H. Electrochemical serotonin sensing interface based on double-layered membrane of reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites and molecularly imprinted polymers embedded with gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 196, 57–63, 2014.

YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, 29 (1) 137-142, 2006.

YANG, N.; CHEN, X.; REN, T.; ZHANG, P.; YANG, D. Carbon nanotube based biosensor. **Sensor and Actuators B: Chemical**, 207, 690-715, 2015.

YANG, Z.; ZHOU D, M. Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, 39, 771-780, 2006.

YUAN, X.; WANG, H.; SONG, C.; ZHANG, J. **Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells. Fundamentals and Applications.** New York: Ed. Springer London, 2010. 420 p.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J.. **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications.** Nova York: Elsevier, 2008.

ZAPP, E.; SILVA, P. S.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Troponin T imunossensor based on liquid crystal and silsesquioxane-supported gold nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, 25, 1638-1643, 2014.

ZDYRKO, B.; HOY, O.; LUZINOV, I. Toward protein imprinting with polymer brushes. **Biointerphases**, 4 (2), FA17-21, 2009.

## 7. APÊNDICE

### 7.1 Apêndice A - Curriculum vitae do autor

**Nome:** Bárbara Virgínia Mendonça da Silva

**Naturalidade:** Telêmaco Borba – PR

**Data de nascimento:** 19/01/1988

#### I. FORMAÇÃO ACADÊMICA

##### I.1 Graduação

###### **Bacharel em Ciências Biológicas**

Universidade de Pernambuco - UPE, Recife – PE

Início: 2006/ Conclusão: 2009. Local: Recife – PE

Título da monografia: Imunossensor eletroquímico baseado na tecnologia de eletrodos impressos para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rosa Amalia Fireman Dutra

##### I.2 Pós-graduação

###### **Mestrado em Biologia Molecular e Celular Aplicada**

Universidade de Pernambuco - UPE, Recife – PE

Início: 2010/ Conclusão: 2012. Local: Recife – PE

Título da dissertação: Emprego de nanomateriais em imunossensores eletroquímicos para detecção da troponina T cardíaca humana

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rosa Amalia Fireman Dutra

#### II. Produção Científica

##### II.1 Artigos publicados ao longo do doutorado

SILVA, B. V. M.; RODRÍGUEZ, B. A. G.; SALES, G. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DUTRA, R. F. An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. **Biosensors & Bioelectronics**, 77, 978-985, 2016.

SILVA, M. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, B. V. M.; GOMES-FILHO, S. L. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F.; DUTRA, R. F. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology (1986)**., 90, 194 - 200, 2015.

FREITAS, T. A.; MATTOS, A. B.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. Amino-Functionalization of Carbon Nanotubes by Using a Factorial Design: Human Cardiac Troponin T Immunosensing Application. **BioMed Research International**, 2014, 1 - 9, 2014.

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

GOMES-FILHO, S. L. R.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, M. M. S.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, 01, 13 - 010, 2013.

## **II.2 Artigos submetido ao longo do doutorado**

SILVA, P. M. S. SILVA; LIMA, A. L. R.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F.; CORREIA, M. T. S. A label-free lectin nanoelectrode based on carbon nanotube/poly-L-lysine for differential diagnostic of prostate câncer. **Biosensors & Bioelectronics**, 2016.

## **II.3 Artigos desenvolvidos ao longo do doutorado (para submissão)**

SILVA, C. E.; SILVA, B. V. M.; RIBEIRO, R. T.; DUTRA, R. F. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for cardiac myocardial infarction based on a conducting polymer - carbon nanotube film. **Talanta**.

LANDIM, V. P. A.; SILVA, B. V. M.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; IOLANDA, C. V.; DUTRA, R. F. A label-free electrochemical immunosensor based on nanohybrid platform of the pyrrole-acid carboxylic and nanoclay: cardiac troponin T application. **Applied Surface Science**.

## **II.4 Participação em Eventos Técnico-Científicos durante o doutorado**

SILVA, B. V. M.; SILVA, C. E.; DUTRA, R. F.; SOTOMAYOR, M. P. T.; SALES, G. ; RODRIGUEZ, B. A cardiac troponin T molecularly imprinted polymer based on electropolymerized pyrrole copolymers at graphene screen printed electrode. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), Rio de Janeiro- RJ, Brasil, 2015.

SILVA, C. E.; SILVA, B. V. M.; CABRAL, D. G. A.; TRINDADE, E. K. G.; DUTRA, R. F.; RODRIGUEZ, B. Synergic effect of the carbon nanotube and polypyrrole in an electrochemical immunosensor of cardiac myocardial infarction. XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2015, Rio de Janeiro –RJ, Brasil, 2015.

DUTRA, R. F.; SILVA, C. E.; SILVA, B.V.M.; RIBEIRO, R.T.; MENEZES, C.E.L.

An ultrasensitive electrochemical immunosensor for cardiac myocardial infarction based on a conducting polymer- carbon nanotube film. XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Uberlândia – MG, Brasil, 2015.

SILVA, P. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, B. V. M.; VICTOR, C. G. O.; COELHO, L. C. B. B.; DUTRA, R. F.; CORREIA, M. T. S. A carbon nanotube-based electrochemical biosensor for detection of methyl- $\alpha$ -d-mannopyranose/fetuin- cramoll lectin interactions. XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), João Pessoa - PB, Brasil, 2014.

LANDIM, V. P. A.; SILVA, B. V. M.; DIAS, A. C. M. S.; FREITAS, T. A.; PIMENTEL, E. N. A.; DUTRA, R. F. Label-free electrochemical immunosensor based on halloysite nanotube and pyrrole-2-carboxylic acid nanohybrid film for cardiac troponin detection. XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), João Pessoa – PB, Brasil, 2014.

SILVA, P. M. S.; SILVA, B.V.M.; TRINDADE, E.; COELHO, L. C. B. B.; DUTRA, R. F. ; CORREIA, M. T. S. . Biossensor eletroquímico nanoestruturado para detecção de glicanos pela lectina de *Cratylia Mollis*. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Uberlândia – MG, Brasil, 2014.

CAVALCANTI, I. T.; SILVA, B. V. M.; LANDIM, V. P. A.; DUTRA, R. F. Immobilization of anti-NS1 antibody on screen-printed gold microelectrode modified with poly(pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylic acid) (PPy/P2C) film for immunosensing applications. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica, Campos do Jordão-SP, Brasil, 2013.

CAVALCANTI, I. T.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. Imunossensor eletroquímico baseado no uso de microeletrodo impresso de ouro funcionalizado com polipirrol para aplicação na dengue. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte - MG, Brasil, 2013.

SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; SILVA, M. M. S.; FREITAS, T. A.; MATTOS, A. B.; DUTRA, R. F. DESENVOLVIMENTO DE SENSORES IMPRESSOS NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA TROPONINA CARDÍACA HUMANA. 52º Congresso Brasileiro de Química, Recife -PE, Brasil, 2012.

CAVALCANTI, I. T.; SILVA, B. V. M.; SILVA, A. C. M.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. Modificação de microeletrodos impressos de ouro com filme de polipirrol para desenvolvimento de imunossensor eletroquímico para a dengue. 52º Congresso Brasileiro de Química, Recife – PE, Brasil, 2012.