



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE RENORBIO

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

**APLICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS COM PROPRIEDADES REDOX EM  
IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS  
PARA DETECÇÃO DIRETA DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO  
TIPO – B (BNP)**

Recife

2018

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

**APLICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS COM PROPRIEDADES REDOX EM  
IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS  
PARA DETECÇÃO DIRETA DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO  
TIPO – B (BNP)**

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

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

Recife  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Landim, Vicente de Paulo dos Anjos

Aplicação de nanocompósitos com propriedades redox em imunossensores eletroquímicos para detecção direta do peptídeo natriurético tipo B (BNP) / Vicente de Paulo dos Anjos Landim. – Recife, 2018.

69 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 2018.

Inclui referências.

1. Coração – Doenças. 2. Insuficiência cardíaca. I. Dutra, Rosa Amália Firemam (orient.) II. Título.

616.12

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 268

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

**APLICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS COM PROPRIEDADES REDOX EM  
IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS  
PARA DETECÇÃO DIRETA DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO  
TIPO – B (BNP)**

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

APROVADA EM: 28 /02 / 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Amalia Fireman Dutra  
(Dept. de Engenharia Biomédica – UFPE) – Orientadora

---

Dr.<sup>a</sup> Bárbara Virgínia Mendonça Da Silva  
(Pesquisadora: Dept. de Engenharia Biomédica – UFPE)

---

Prof.<sup>sa</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Luciana Santos Afonso de Melo  
(Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Fontes  
(Dept. de Biofísica e Radiobiologia– UFPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Tereza dos Santos Correia  
(Dept. de Bioquímica - UFPE)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Suelita Landim e Antônio Landim (in memoriam) e a minha segunda mãe, tia Chiquinha por todo amor, dedicação e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua bondade e misericórdia infinita, fazendo-me perseverar nesse caminho mesmo que em meio a tantas lutas e adversidades.

À professora Rosa Dutra, pela oportunidade concedida, confiança, ensinamentos.

Aos meus irmãos Yáskara, Antônio Filho e Landim Neto pelo apoio e incentivo.

Ao meu companheiro de todas as horas Pedro Bezerra pelo total apoio, companheirismo e compreensão.

Aos amigos Henrique, Heberth, Micaías e Yvi pelos inúmeros momentos felizes em Recife e por fazerem parte desse momento.

À minha amiga e co-orientadora Bárbara Virginia pelos ensinamentos, companheirismo e apoio desde o mestrado.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico (LAPED), pelos momentos compartilhados.

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

Muito obrigado!

*“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)*

## RESUMO

A detecção eletroquímica da interação antígeno-anticorpo nos imunossensores não marcados, convencionalmente, utiliza-se espécies eletroativas de sondas redox para realização das leituras amperométricas. O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em um filme nanocompósito com propriedades redox para detecção direta do peptídeo natriurético do tipo B (BNP), importante marcador da insuficiência cardíaca (IC). A presença de mediadores de elétrons ancorados intrinsecamente no filme nanocompósito permite que estes sensores sejam operados em um potencial menor, reduzindo a possibilidade de interferências nas análises. Dentre os diferentes nanomateriais utilizados, os nanotubos de carbono (NTCs) têm se destacado devido à sua elevada relação razão de aspecto e reatividade química com diferentes mediadores redox. Para construção da plataforma sensora, eletrodos impressos foram modificados com uma solução de NTCs carboxilados funcionalizados com Ftalocianina de cobalto (NTCs-FtCo), utilizando a técnica de “*dip-coating*”. Em seguida, os eletrodos com filme nanocompósito foram modificados com uma solução de etilenodiamina (EDA) para imobilização dos anticorpos anti-BNP via porção Fc. Os grupos não-reativos da superfície após a imobilização foram bloqueados com uma solução de glicina. A caracterização eletroquímica do sensor foi realizada usando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria linear. Análises por Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR) foram empregadas para avaliação do processo de formação do nanocompósito de NTC-FtCo-EDA. O filme obtido sobre a superfície dos eletrodos impressos apresentou boa estabilidade quando submetido às sucessivas leituras voltamétricas. Ensaio para padronização da concentração do anticorpo anti-BNP imobilizado e tempo de interação antígeno-anticorpo foram realizados e otimizados. A resposta analítica do imunossensor para as diferentes concentrações do BNP (10 – 1000 pg/mL) foi obtida através do método de voltametria de varredura linear em solução de KCl (0.1 M), dispensando o uso de sonda redox na solução eletrólita. O dispositivo proposto apresentou boa linearidade ( $r = 0,9966$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) para determinação eletroquímica do BNP, apresentando um limite de detecção de 3 pg/mL. O imunossensor desenvolvido apresentou sensibilidade para a detecção livre de sonda redox do BNP, representando uma potencial ferramenta para aplicação como teste rápido no diagnóstico das doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Ftalocianina De Cobalto. Imunossensor Nacomposto Eletrocatalítico. Insuficiência Cardíaca. Peptídeo Natriurético Do Tipo B.

## ABSTRACT

Electrochemical detection of the antigen-antibody interaction in unlabeled immunosensors conventionally uses electrode redox probes to perform the amperometric readings. The invention describes the development of an electrochemical immunosensor based on a nanocomposite film with redox properties for the direct detection of type B natriuretic peptide (BNP). The presence of electron mediators anchored intrinsically in the nanocomposite film allows these sensors to be operated at a lower potential, reducing the possibility of interferences in the analyzes. Among the different nanomaterials used, carbon nanotubes (NTCs) have been outstanding due to their high ratio of aspect ratio and chemical reactivity with different redox mediators. For the construction of the sensor platform, printed electrodes were modified with a solution of carboxylated NTCs functionalized with FtCo (NTCs-FtCo), using dip-coating technique. Then, the electrodes with nanocomposite film were modified with a solution of ethylenediamine (EDA) to immobilize the anti-BNP antibodies via the Fc portion. The non-reactive groups of the NTC-FtCo-EDA film were blocked with a glycine solution (100 mM) prepared in PBS buffer (10 mM, pH.9.0). The electrochemical characterization of the sensor was performed using the techniques of cyclic voltammetry and linear voltammetry. Fourier Transform Spectroscopy (FTIR) analyzes were used to confirm the NTC-FtCo-EDA nanocomposite construction process. The film obtained on the printed electrode surface showed good stability when subjected to successive voltammetric readings. Assays for standardization of immobilized anti-BNP antibody concentration and antigen-antibody interaction time were performed and optimized. The analytical response of the immunosensor to the different concentrations of BNP (10 - 1000 pg / mL) was obtained by the linear scanning voltammetry method in KCl solution (0.1 M), avoiding the use of redox probe in the electrolyte. The proposed device presented good linearity with  $r = 0.9966$  ( $p < 0.01$ ;  $n = 6$ ) for the electrochemical determination of BNP, with a detection limit of 3 pg / mL. The developed immunosensor presented excellent sensitivity for the free detection of BNP redox probe, representing a potential tool for application as a rapid test in the diagnosis of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Cobalt Phthalocyanine. Carbon Nanotubes. Polyethylenediamine. Cardiac Insufficiency. Type B Natriuretic Peptide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	Representação de um coração normal (a) e um coração com insuficiência cardíaca (b) .....	17
<b>FIGURA 2 -</b>	Estrutura do Peptídeo Natriurético do tipo B .....	21
<b>FIGURA 3 -</b>	Representação esquemática de um biossensor dos elementos de composição de um biossensor .....	23
<b>FIGURA 4 -</b>	Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a superfície sensora .....	26
<b>FIGURA 5 -</b>	Sistema eletroquímico constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar (fio de platina) em uma célula eletroquímica com um eletrólito suporte.....	28
<b>FIGURA 6 -</b>	Partes constituintes de um eletrodo impresso .....	30
<b>FIGURA 7 -</b>	Estrutura dos nanotubos de carbono (a) nanotubos de paredes simples (b) nanotubos de paredes múltiplas .....	31
<b>FIGURA 8 -</b>	Representação da estrutura química da ftalocianina de cobalto ....	33
<b>FIGURA 9 -</b>	Representação gráfica da técnica de voltametria cíclica .....	37
<b>FIGURA 10 -</b>	Representação esquemática da técnica de voltametria de varredura linear .....	37
<b>FIGURA 11 -</b>	Esquema do princípio de um espectrômetro de FTIR na geração de um espectro.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	-	Microscopia de força atômica, do inglês “ <i>Atomic Force Microscopy</i> ”
BNP	-	Peptídeo Natriurético Tipo B
E	-	Potencial
ECLIA	-	Imunoensaios por eletroquimioluminescência, do inglês “ <i>Electrochemiluminescence Immunossay</i> ”
EDA	-	Etilenodiamino
ECG	-	Eletrocardiograma
EIs	-	Eletrodos impressos, do inglês “ <i>Screen-printed electrodes</i> ” (SPE)
ELISA	-	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima, do inglês “ <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ”
FT-IR	-	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês “ <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ”
I	-	Corrente
IC	-	Insuficiência Cardíaca
IL	-	Líquidos iônicos
$I_{pa}$	-	Corrente de pico anódico
$I_{pc}$	-	Corrente de pico catódico
IUPAC	-	“ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”- União Internacional de Química Pura e Aplicada
mL	-	Mililitros
NTCs	-	Nanotubos de Carbono
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PBS	-	Tampão fosfato salino
pg	-	Picogramas
$v^{1/2}$	-	Raiz quadrada da velocidade de varredura
VC	-	Voltametria Cíclica
VPD	-	Voltametria de Pulso Diferencial
$\Delta I$	-	Variações de corrente de pico
$\mu\text{m}$	-	Micrômetros
$\mu\text{L}$	-	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivos Gerais .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1	INSUFICIÊNCIA CARDÍACA .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Diagnóstico da Insuficiência Cardíaca .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Peptídeo Natriurético do tipo B .....</b>	<b>20</b>
2.2	BIOSSENSORES .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Imunossensores .....</b>	<b>24</b>
2.2.1.1	Técnicas de Imobilização de Anticorpos .....	25
2.2.1.2	Transdutores em Imunossensores .....	27
2.2.1.3	Transdutores Eletroquímicos .....	27
2.3	NOVAS TENDÊNCIAS EM PLATAFORMAS SENSORAS .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Eletrodos Impressos .....</b>	<b>29</b>
2.4	MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA .....	30
<b>2.4.1</b>	<b>Nanotubos de Carbono .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Ftalocianina de Cobalto .....</b>	<b>32</b>
2.5	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIES SENSORAS .....	35
<b>2.5.1</b>	<b>Técnicas Eletroquímicas .....</b>	<b>35</b>
2.5.1.1	Voltametria Cíclica .....	35
2.5.1.2	Voltametria de Varredura Linear .....	37
2.6	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DE SUPERFÍCIES EM BIOSSENSORES .....	38
<b>2.6.1</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....</b>	<b>38</b>
2.7	BIOSSENSORES PARA BNP .....	39
<b>3</b>	<b>PEDIDO DE PATENTE.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) permanecem como a principal causa de mortalidade no mundo, sendo responsáveis por cerca de 30% de todas as mortes. Dentre as diferentes apresentações das DCVs, a insuficiência cardíaca (IC) tem importante destaque na sua contribuição para a morbimortalidade do paciente, sendo a via final de todas as injúrias que acometem o coração (WHO, 2017). De acordo com as projeções da “*American Heart Association*” (AHA), a prevalência da IC aumentará 46% de 2012 a 2030, resultando em mais de 8 milhões de pessoas maiores de 18 anos com IC. Esse aumento na prevalência deve-se provavelmente ao aumento da expectativa de vida, uma vez que a IC acomete de forma preponderante faixas etárias mais elevadas (HEIDENREICH et al., 2013).

A IC é uma síndrome de alta complexidade, caracterizada pela redução do débito cardíaco, devido às alterações na estrutura e função do coração que dificultam o bombeamento sanguíneo suficiente para atender às necessidades metabólicas dos tecidos. O diagnóstico da IC ocorre na maioria das vezes baseado na história clínica do paciente, na sintomatologia e no exame físico. Dessa forma, reconhecer os sintomas e fatores de riscos da IC são essenciais para garantir o diagnóstico precoce e tratamento adequado.

Para diagnóstico da IC são realizados exames como a radiografia de tórax, eletrocardiograma (ECG) e exames laboratoriais para dosagem do peptídeo natriurético do tipo B (BNP). A associação da dosagem do BNP ao exame clínico aumenta a acurácia diagnóstica, de modo que, em situações de dúvida no exame clínico, o BNP pode ser utilizado para descartar a IC. O BNP é um importante biomarcador da função cardíaca, sendo um preditor independente de eventos cardiovasculares e de mortalidade em diferentes populações. Em pacientes com fração de ejeção normal, valores do BNP acima de 100 pg/mL indicam forte predição de disfunção diastólica grave (JORGE et al., 2014).

Na busca de desenvolver novas tecnologias para diagnóstico da IC, os biossensores surgem como importantes ferramentas analíticas, por sua alta sensibilidade, praticidade, possibilidade de análise em tempo real, resposta rápida e compatibilidade com as tecnologias de produção de sensores em larga escala. Biossensores são dispositivos analíticos compostos por um componente biológico conectado a um transdutor, sendo este capaz de converter o sinal bioquímico gerado pela reação com o analito de interesse em um sinal elétrico mensurável. Quando nestes dispositivos são utilizados como biorreceptores antígenos ou anticorpos, os mesmos são classificados como imunossensores.

Diferentes tipos de transdução podem ser utilizadas em imunossensores (ótica, piezoelétrica, térmica, eletroquímica), na qual sua escolha depende da natureza das reações entre o biorreceptor e o analito. Devido às reações antígeno-anticorpo não gerarem espécies eletroativas, muitos imunossensores eletroquímicos utilizaram a estratégia de quantificar os imunocomponentes, a partir das reações bioquímicas decorrentes de anticorpos ou antígenos conjugados às enzimas. Entretanto, estes imunossensores apresentam limitações semelhantes aos imunoensaioenzimáticos, tais como demora no tempo de análise, envolvimento de várias etapas de incubação e custos elevados. Na tentativa de superar tais limitações, os imunossensores não marcados substituíram os conjugados por soluções redox, sendo esses baseados na diminuição da difusão das espécies eletroativas na superfície sensora, decorrente das biomoléculas identificadas, visto que estas são de natureza isolante. Esta diminuição da difusão pode ser detectada por técnicas amperométricas ou impedimétricas, por exemplo.

Apesar de grandes avanços, uma das limitações desses imunossensores eletroquímicos não marcados está na impossibilidade de medida em tempo real, principalmente em amostras biológicas (soro, sangue total, urina, etc), uma vez que há necessidade de retirá-las para realização das leituras na presença de espécies eletroativas (sonda redox) para geração do sinal elétrico. Nas últimas décadas, os nanotubos de carbono (NTCs) têm sido um importante agregado no desenvolvimento de imunossensores, sobretudo os eletroquímicos. Por apresentarem excelentes propriedades eletroanalíticas, tais como alta condutividade elétrica, estabilidade química, elevada razão de aspecto e grande área superficial, os NTCs podem contribuir para o aumento sensibilidade e especificidade diagnóstica. Quando adequadamente funcionalizados, os NTCs permitem imobilização de biomoléculas de modo orientado e mais estável, além de promoverem uma maior quantidade de anticorpos ou antígenos por área eletrodica. A possibilidade de utilização dos NTCs, agora, com propriedades redox, apresenta-se como uma interessante estratégia para superar as limitações dos sensores não marcados. As ftalocianinas metálicas têm sido bastante estudadas na eletroquímica por suas interessantes propriedades redox. Estas atuam como mediadores de elétrons para algumas moléculas, funcionando como catalizadores ativos em diversas reações de modo rápido e com pouco gasto de energia. Diante do exposto, nesta tese foi proposto o desenvolvimento de um imunossensor não marcado, livre de sonda redox para detecção eletroquímica direta do BNP. A plataforma sensora foi baseada em um filme de nanocompósito formado por NTCs funcionalizados com ftalocianina de cobalto (FtCo) e anticorpos anti-BNP imobilizados via etilenodiamina. As respostas da interação do anticorpo

com as moléculas de BNP detectadas nas amostras foram medidas por alteração direta da corrente elétrica ao potencial de pico catódico decorrente da redução da FtCo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver imunossensor eletroquímico livre de marcação (*label-free*) para detecção do peptídeo natriurético tipo – B (BNP) baseada em um filme nanocompósito de NTC-FtCo por medida amperométrica que dispense o uso de solução de sonda redox.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

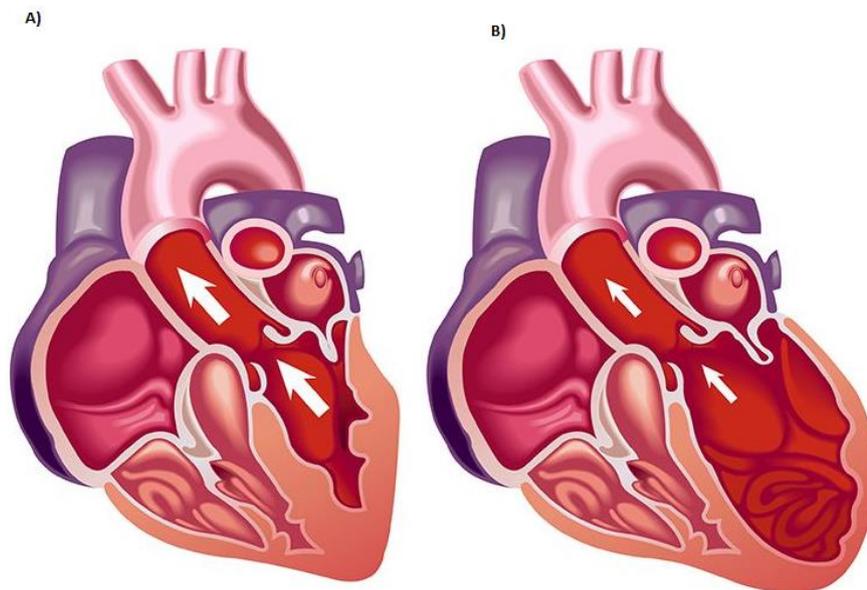
- Desenvolver uma plataforma sensora empregando eletrodos impressos modificados com um filme de nanotubos de carbono-ftalocianina de cobalto e etilenodiamina, visando à aplicação em ensaios eletroquímicos;
- Realizar a caracterização química do filme utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier;
- Imobilizar anticorpos anti-BNP na plataforma sensora;
- Otimizar os parâmetros experimentais para determinação do BNP, como, concentração de anticorpo.
- Estabelecer curvas analíticas do imunossensor para determinação do BNP em amostra padrão e de soro enriquecido com BNP.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA (IC)

As DCVs encontram-se entre as principais causas de morte no mundo. Dentre as DCVs a IC, tem papel importante para a morbimortalidade, sendo a via final de todas as injúrias que acometem o coração. A IC caracteriza-se como uma síndrome de alta complexidade devido ao progressivo aumento do dano do músculo cardíaco e consequente perda da função de bombeamento por parte dos ventrículos (figura 1) (BOCCHI et al., 2009; HUNT et al., 2009; BOCCHI et al., 2013).

**Figura 1** - Representação de um coração normal (a) e um coração com insuficiência cardíaca (b).



FONTE: Google imagens (2018).

Cerca de 23 milhões de pessoas são portadoras de IC, a cada ano 2 milhões de novos casos são diagnosticados, tornando-se a primeira causa de internação hospitalar em pacientes acima de 60 anos de idade no Brasil. Nos últimos anos, a prevalência da IC vem aumentando em todo o mundo (BOCCHI et al., 2012). Isso ocorre devido há alguns fatores, como o envelhecimento da população e os avanços terapêuticos no tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e até mesmo da IC, que melhoram a sobrevida e, conseqüentemente, promovem o aumento em sua prevalência (BOCCHI et al., 2009). Segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), em 2012 foram realizadas cerca de 238 mil internações por IC, com

notificação de 26 mil óbitos durante as internações (BRASIL, 2017). As projeções apontam que a prevalência da IC deve aumentar em até 46% de 2012 a 2030, o que resultará em mais de 8 milhões de pessoas com IC (NOGUEIRA et al., 2010; BOCCHI et al., 2012). De acordo com o “*Brazilian Registry of Acute Heart Failure*” (BREATHE), algumas comorbidades associadas à IC pioram seu prognóstico, tais como: i) a fibrilação atrial (FA), que atinge cerca de 20 a 30% dos pacientes com IC aguda; ii) a insuficiência renal, que pode chegar a 29,6%, sendo um marcador de mau prognóstico; iii) hiponatremia; iv) níveis elevados de Peptídeo Natriurético Tipo B (BNP); v) múltiplas internações e vi) doença pulmonar associada (YANCY et al., 2013; FEOLA et al., 2016).

A IC pode ser dividida em aguda e crônica, a fase aguda está relacionada ao parecimento de insuficiência inaugural e súbita, e a fase crônica da doença caracteriza-se por sintomas como fadiga e a dispneia, que tem origem nas alterações do músculo esquelético. No processo fisiopatológico da IC inicialmente, o coração não responde de forma suficiente ao exercício, o que levará a uma hipoperfusão dos tecidos periféricos, conseqüentemente, o sangue não chegará em quantidade suficiente ao músculo em exercício, devido ao bombeamento ineficiente do mesmo. Então, na tentativa de manter o débito cardíaco, é necessário o aumento da pressão de enchimento ventricular. Este aumento poderá levar a transferência de líquido para os alvéolos, o que levará a dispneia. Inicialmente na IC, a dispneia ocorre apenas em resposta ao esforço, mas com a evolução da doença, ela poderá se manifestar até em repouso. Edemas periféricos surgem como resultado da retenção de líquidos, o que pode ser interpretado como um sinal da IC (CLARK, et al, 2005; BOCCHI et al, 2009).

A IC crônica pode ser classificada em 4 classes, de acordo com a intensidade de sintomas, como proposto pela “*New York Heart Association*”. Nessa classificação é possível analisar o grau de limitação imposto pela doença em relação as atividades cotidianas do indivíduo. É uma classificação de caráter funcional e possibilita avaliar a qualidade de vida do paciente frente a sua doença. Na primeira classe, o paciente não apresenta sintomas durante as atividades cotidianas, ou seja, as limitações que podem aparecer são semelhantes às esperadas em indivíduos normais. Na segunda classe, o indivíduo apresenta sintomas que são desencadeados a partir da execução de atividades cotidianas. Na terceira classe, os sintomas ficam evidentes mesmo em atividades menos intensas que as cotidianas, ou seja, apresenta sintomas ao realizar pequenos esforços. Na quarta e última classe, os sintomas estarão presentes ainda que o indivíduo esteja em repouso (SCRUTINIO et al, 1994).

Além dessa classificação funcional, também é possível classificar a IC com base na progressão da doença, de acordo com dados clínicos e histórico do paciente. Dessa forma, é possível avaliar, além do momento evolutivo da doença em que o paciente se encontra, a qualidade de vida e o prognóstico, estabelecendo prioridades e linhas terapêuticas (BOCCHI et al, 2009). O número de adultos em idade produtiva acometidos pela IC tem crescido nos últimos anos, o que tem causado grande ônus à sociedade, principalmente pelo aspecto limitante dessa doença. Com isso, a IC desencadeia grande impacto socioeconômico, podendo se tornar ainda maior nos próximos anos. A conduta da equipe de saúde logo na chegada do paciente à emergência e o tratamento precoce tem papel fundamental na sua recuperação e impacto direto sobre a morbidade e mortalidade. Dessa forma, o diagnóstico realizado de forma rápida é essencial para auxiliar na tomada de decisão por parte da equipe médica (BOCCHI et al., 2009).

### **2.1.1 Diagnóstico da Insuficiência Cardíaca**

O diagnóstico clínico da IC pode ser realizado através da utilização dos critérios clínicos de Framingham, apresentados em 1971, e que atualmente ainda são bastante utilizados. O mesmo visa identificar sinais e sintomas numa classificação de critérios maiores tais como: dispneia paraxística noturna, turgência jugular, creptações pulmonares, cardiomegalia, edema agudo de pulmão e critérios menores como: edema de tornozelo bilateral, tosse noturna, dispneia aos esforços ordinários, hepatomegalia e derrame pleural. Para uma confirmação clínica do diagnóstico da IC é necessário a presença simultânea de pelo menos dois critérios maiores ou um critério maior e dois critérios menores (MCKEE et al., 1971; BOCCHI et al., 2012).

Embora o exame clínico seja uma ferramenta bastante usada para um diagnóstico inicial da IC, o mesmo apresenta uma acurácia intermediária, uma vez que aos sinais e sintomas não são específicos apenas da IC. Isso pode ocorrer devido ao aparecimento de sintomas isolados, pois os mesmos podem ser atribuídos a outras patologias ou até mesmo à idade avançada do paciente (BOCCHI et al., 2009; BRAUNWALD, 2013).

A avaliação inicial do paciente com IC é importante para confirmar o diagnóstico, além de buscar identificar a etiologia e possíveis fatores precipitantes da doença. Quando existe a suspeita clínica de IC, após a realização do exame clínico é importante recorrer a outras formas de diagnóstico para assegurar, em definitivo, a presença da lesão cardíaca. Os

exames de primeira linha são: o eletrocardiograma, o raio-X e a dosagem do BNP (BRAUNWALD, 2013).

Pacientes com suspeita de IC, comumente apresentam alterações no eletrocardiograma, tais como fibrilação atrial e sobrecarga atrial e/ou ventricular esquerda. Quando o eletrocardiograma se apresenta completamente normal torna a presença de IC provavelmente negativa, principalmente se a presença da IC tiver origem na disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (BOCCHI et al., 2012; BRAUNWALD, 2013).

O valor preditivo do Raio-x na IC está associado a sintomatologia típica da IC ou quando se tem um eletrocardiograma com alterações. Nesses casos, a presença de cardiomegalia e congestão pulmonar são achados importantes (BOCCHI et al., 2012).

A utilização de biomarcadores para o diagnóstico da IC tem sido amplamente difundida, como consequência surgiram novas pesquisas em busca do biomarcador ideal para IC. Os biomarcadores podem ser utilizados com a função de auxiliar no diagnóstico e avaliar o prognóstico clínico em conjunto com uma análise individual do contexto de cada paciente (OMLAND, 2009).

A dosagem do BNP é um exame importante no diagnóstico da IC, podendo apresentar pequenas variações nas concentrações séricas nas primeiras horas do aparecimento da lesão cardíaca. Embora em pacientes muito idosos é necessário um acompanhamento mais cuidadoso para verificar alteração em exames anteriores, uma vez que os níveis de BNP podem aumentar de acordo com a idade. Em indivíduos acima dos 75 anos e sem a presença de IC, os níveis de BNP são duas vezes mais concentrados que a população mais jovem (BOCCHI et al., 2012; BRAUNWALD, 2013).

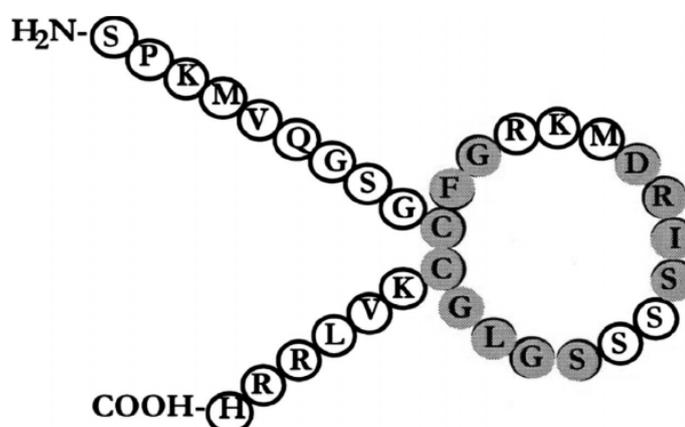
### **2.1.2 Peptídeo Natriurético do tipo - B**

Atualmente, os peptídeos natriuréticos fazem parte dos testes diagnósticos auxiliares na tomada de decisão clínica em pacientes que sofrem de IC, os mesmos passaram a ser estudados na década de 1980, mas só foram precisamente descobertos no ano de 1988, em um tecido cerebral suíno. A produção do BNP ocorre em ambos os átrios e ventrículos por meio de estímulos de dilatação cardíaca, isquemia do miocárdio ou pela ativação simpática e do sistema renina-angiostensina-aldosterona (SILVA et al., 2014). O BNP possui o potencial de apontar o aumento de pressões elevadas intracardíacas, o que reflete no estiramento das fibras miocárdicas devido à congestão (NETO et al., 2004; FRANCIS et al., 2016). Existem duas

frações que podem ser dosadas no sangue, o NT-pro-BNP que é a fração inativa e o BNP que é a fração ativa (VILLACORTA et al., 2007).

O BNP é um polipeptídeo com 32 aminoácidos que possui na sua estrutura química um anel peptídico com 17 aminoácidos comuns a todos os peptídeos natriuréticos (Figura 2). A preservação desse anel ocorre filogeneticamente e constitui a porção onde estão os hormônios peptídicos que são responsáveis por se ligar aos seus receptores específicos. Além desse anel peptídico, existem dois braços projetados cada um com um terminal específico, no qual em um está o terminal NH<sub>2</sub> (amina) e o outro COOH (carboxila) (KAWAKOSHI et al., 2004).

**Figura 2** - Estrutura do peptídeo natriurético do tipo B.



**FONTE:** (KAWAKOSHI et al., 2004).

O BNP é liberado em resposta ao aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo e ao estresse parietal diastólico final desse ventrículo. Níveis séricos de BNP são úteis tanto para o diagnóstico, como para prognóstico da IC. Quanto mais elevados os níveis do peptídeo, pior será a evolução do paciente, maior o tempo de internação e maior o índice de mortalidade da doença (JORGE et al., 2013).

A dosagem de BNP é potencialmente capaz de excluir um diagnóstico quando a causa não for cardíaca, o que contribui para uma melhor investigação, bem como redução de custos com exames adicionais como o eletrocardiograma e a ecocardiografia em pacientes com níveis de BNP abaixo do limiar de corte (ROBERTS et al., 2015). A detecção deste marcador vem sendo amplamente utilizada ao longo dos últimos quinze anos, tanto para diagnosticar, quanto para monitorar pacientes com IC, tal aplicação tem revolucionado os cuidados clínicos destes pacientes. Isso se deve ao fato do tratamento ser melhor direcionado pelo uso de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos, de modo que consequentemente a equipe médica pode viabilizar a terapia apropriada (SILVA, 2014).

O BNP possui alta especificidade para o diagnóstico da IC. A agência reguladora dos EUA (FDA – do inglês “*Food and Drug Administration*”) determinou um limite de BNP para decisão de exclusão no diagnóstico de IC; assim, pacientes com níveis menores que 100 pg/mL tem o diagnóstico da IC descartado. Valores entre 100 e 200 pg/mL de BNP estariam em uma zona cinza, sugerida como um valor intermediário e de precisão diagnóstica para IC, nesta situação, um ponto crucial será o julgamento da história clínica do paciente que assumirá um importante papel na tomada de decisão pela equipe de saúde. A partir de 400 pg/mL servem como confirmação de diagnóstico, com exceção dos pacientes acima de 75 anos nos quais o diagnóstico é provável devido ao aumento normal nos níveis de BNP devido à idade avançada (COSTE et al., 2006; MAISEL et al., 2008; CHOUDHARY et al, 2013).

Os primeiros métodos para determinação do BNP plasmático foram disponibilizados no ano de 1990, no qual eram usados dois métodos, primeiro, o imunoenensaio competitivo, empregando radioimunensaio (RIA) e, segundo, o imunensaio de fluorescência. Atualmente, na prática laboratorial, a detecção do BNP é realizada por imunensaioenzimático (ELISA – do inglês “*enzyme linked immunosorbent assay*”), porém este é ainda um método demorado e necessita de profissionais capacitados para realização dos ensaios (AHMED et al., 2014).

Portanto, diante das evidências, é possível identificar que a dosagem desse biomarcador é determinante para o diagnóstico e prognóstico de pacientes com IC, mas ainda é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para quantificação do BNP em tempo real, com o objetivo de reduzir o tempo de execução desses ensaios, sem que haja perda da especificidade e a sensibilidade dos métodos convencionais.

## 2.2 BIOSSENSORES

Os biossensores são um dos mais atrativos métodos analíticos no ramo da detecção imunológica. Destacam-se nas mais diferentes áreas como ciência forense, indústria de alimentos, diagnósticos clínicos e monitoramento ambiental, por apresentar importantes características, como rapidez, facilidade na execução, baixo custo e praticidade (OSMA & STOYTCHIEVA, 2014; HASAN, 2014).

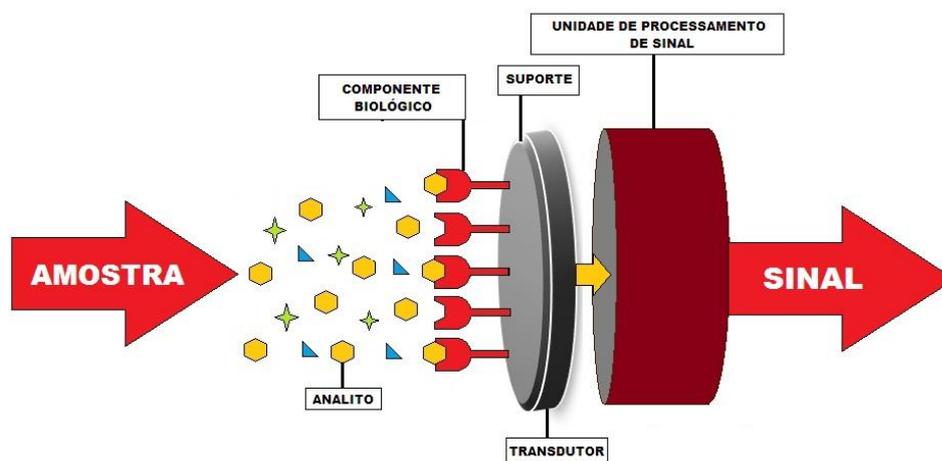
CLARK & LYONS (1962) demonstraram o primeiro biossensor desenvolvido para determinação da glicose. A tecnologia desse trabalho foi transferida e industrializada pela *Yelow Spring Instrument Company* levando ao lançamento comercial do primeiro biossensor de glicose em 1975. A partir daí, diversas formas de biossensores para glicose foram

desenvolvidas (RICCI & PALLESCHI, 2005), assim como muitas outras tecnologias de dispositivos sensores (ARYA et al., 2008; SILVA et al., 2013).

A indústria de biossensores tem crescido muito nos últimos anos, bem como os grandes avanços destes dispositivos em aplicações clínicas e não clínicas. Segundo pesquisas, em 2013 o mercado de biossensores estava avaliado em 11,39 bilhões de dólares e estima-se que até 2020 possa alcançar 22,68 bilhões de dólares. O crescimento desse mercado deve-se, principalmente, ao aumento na demanda dos testes diagnósticos de pronto atendimento ou à beira do leito, devido ao aumento na prevalência de diversas doenças, tais como diabetes, DCVs, envelhecimento da população e a crescente busca por tecnologias de suporte a saúde (MARKETS & MARKETS, 2015).

Segundo definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor é um dispositivo analítico capaz de fornecer informações quantitativas ou qualitativas específicas através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (biomoléculas) conectado a um transdutor que é capaz de reconhecer o sinal biológico e converter em um sinal mensurável (HERNÁNDEZ & OSMA, 2014). Dessa forma, ele é constituído pelo componente biológico e um transdutor como pode ser observado na Figura 3.

**Figura 3** - Representação esquemática dos elementos de composição de um Biossensor.



FONTE: (próprio autor)

A biomolécula é um elemento de reconhecimento do analito de interesse, responsável pela seletividade e especificidade dos biossensores. O transdutor é responsável pela conversão do sinal bioquímico, resultante da interação da biomolécula com o analito alvo, em um sinal

quantificável . O nível de sinal gerado está relacionado proporcionalmente à concentração do analito (DIAS, 2015).

Em relação ao transdutor utilizado, os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos, acústicos ou piezelétricos, ópticos e térmicos. O transdutor eletroquímico é um dos mais utilizados e baseia-se na medição das variações de uma propriedade elétrica resultante da interação do analito com o biorreceptor. De acordo com a propriedade elétrica explorada, a detecção eletroquímica pode ser podendo ser: amperométrico, condutimétrico, potenciométrico e impedimétrico (STRADIOTTO et al., 2003; RABA et al., 2013). O princípio dos transdutores ópticos baseia-se nas variações de resposta aos estímulos da luz como resultado da interação do biorreceptor com o analito de interesse. Diversos sistemas ópticos utilizam esse tipo de transdução, tais como os diferentes tipos de espectroscopias, sistemas de ressonância de plásmon de superfície (SPR, do inglês “*Surface Plasmon Resonance*”) e interferometria (ABDULHALIM et al., 2007; ABDULHALIM et al., 2008).

Os transdutores piezelétricos detectam variações de vibração dos cristais piezelétricos em resposta à interação da biomolécula com o analito alvo. Neste tipo de transdução, o cristal piezelétrico comporta-se como uma microbalança que detecta a interação biomolécula-analito. As variações de vibração dos cristais são proporcionais à quantidade de material adsorvido no evento de bioreconhecimento (PERUMAL & HASHIM, 2014).

Os biossensores também são classificados de acordo com o elemento de bioreconhecimento, pois diferentes moléculas biológicas podem ser utilizadas como biorreceptores em biossensores, tais como enzimas, anticorpos ou antígenos, lectinas, DNA ou RNA, dentre outros, pode-se subdividi-los em enzimáticos ou de afinidade de acordo com o tipo de biomolécula empregada e a natureza da interação bioquímica que ocorrerá com o reconhecimento do analito alvo (RABA et al., 2013; BERTÓK et al., 2013; PERUMAL & HASHIM, 2014).

### **2.2.1 Imunossensores**

Os biossensores são denominados imunossensores quando anticorpos ou antígenos são utilizados como elementos de bioreconhecimento para seus analitos específicos (CONROY et al., 2009). O desenvolvimento de imunossensores com boa seletividade e sensibilidade é possibilitado pela alta afinidade de interação do anticorpo com seu alvo antigênico, associada aos sistemas transdutores (LI et al., 2013; GOPINATH et al., 2014)

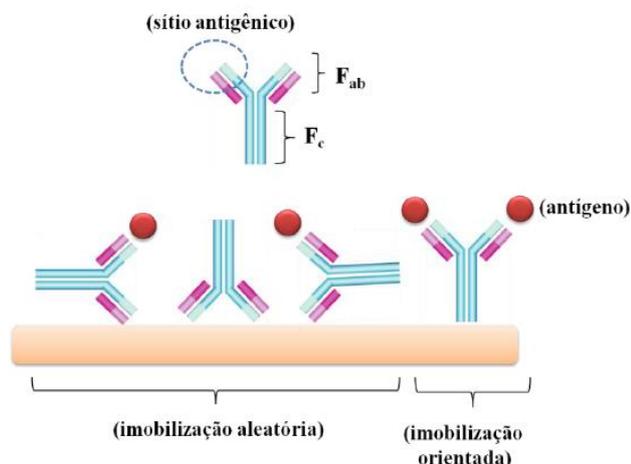
Os imunossensores podem detectar a formação de imunocomplexos na superfície sensora com alta confiabilidade devido à especificidade e seletividade da interação anticorpo-antígeno (CHEN et al., 2009). De acordo com o envolvimento de marcadores conjugados aos imunorreagentes, os imunossensores podem ser classificados como marcados e não-marcados (*label-free*). A maioria dos imunossensores marcados, descritos na literatura, exploram o princípio dos imunoenaios tipo competitivo e sanduíche utilizando enzimas, fluoróforos e nanopartículas metálicas e magnéticas como marcadores. Apesar de seletivos, os imunossensores marcados implicam em elevados custos operacionais, incluindo aumento das etapas de processamento da amostra. Já nos ensaios não marcados, a resposta do imunossensor é obtida diretamente após o evento de biorreconhecimento (QIU et al., 2009; RAPP et al., 2010; GOPINATH et al., 2014).

#### 2.2.1.1 Técnicas de imobilização dos anticorpos

Na construção do imunossensor, uma das etapas essenciais é a incorporação estável dos antígenos ou anticorpos, pois quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, fazendo com que o imunossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o analito alvo (CHEN & DONG, 2003).

A técnica usada para imobilização desses anticorpos pode interferir diretamente na capacidade de reconhecimento antigênico podendo influenciar na sensibilidade analítica do dispositivo. Como demonstrado na Figura 4, é possível perceber como a organização dos anticorpos sobre a superfície sensora afeta diretamente no processo de biorreconhecimento antigênico, pois a imobilização de modo aleatório desses anticorpos interfere na interação antígeno-anticorpo-(TRILLING et al., 2013).

**Figura 4** - Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a superfície sensora.



FONTE: (SILVA, 2016).

Uma característica desejável no método de imobilização escolhido é que ele resulte em um anticorpo imobilizado orientadamente, ou seja, com o mínimo de impedimento estérico, para interagir favoravelmente com seu antígeno alvo. Evidentemente, esta característica tem uma influência direta sobre o nível de sensibilidade do imunossensor (FOWLER et al., 2008).

Na imobilização de anticorpos dois métodos são bastante empregados, os quais empregam ligações covalentes e não covalentes. O método de imobilização não covalente é realizado por adsorção física, através de ligações iônicas, interações eletrostáticas, forças de Vander Waals e interações hidrofóbicas. A utilização desse tipo de imobilização é bastante comum devido à sua simplicidade, embora o mesmo tenha um baixo controle sobre a disposição dos anticorpos na superfície sensora, além de sofrer influências devido mudanças de pH, temperatura e força iônica do meio (JUNG et al., 2008).

Por outro lado, a imobilização covalente é um método mais estável devido a possibilidade de se controlar a disposição dos anticorpos através da utilização de grupos químicos mutuamente reativos. Diversos trabalhos na literatura exploram grupos funcionais presentes no anticorpo, tais como os grupos aminos ( $-NH_2$ ), carboxílicos ( $-COOH$ ), hidroxílicos ( $-OH$ ) e tióis ( $-SH$ ). Estrategicamente, a porção Fc do anticorpo pode ser usada para imobilização covalente e orientada, pois os grupos carboxílicos podem interagir com superfícies amino funcionalizadas formando ligações amidas (REDEKER et al., 2013).

Alguns compostos químicos são utilizados para imobilização de biomoléculas através da exploração de seus grupos funcionais, resalto aqui a utilização da etilenodiamina (EDA), de fórmula  $C_2H_4(NH_2)_2$ , a qual é um líquido volátil incolor com odor semelhante a amônia. A utilização de EDA no desenvolvimento de filmes poliméricos através da deposição química

tem sido aplicada em diversas áreas como aplicação em membranas, sistemas de eletrodos enzimáticos, dentre outras aplicações (BIEDERMAN et al., 2001; CHOUKOROV et al., 2004).

Portanto, para o desenvolvimento de tecnologias nesse campo de conhecimento é essencial a compreensão das interações a nível molecular entre o elemento de modificação da superfície sensora e a biomolécula utilizada (OLIVEIRA, 2013).

#### 2.2.1.2 Transdutores em Imunossensores

De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores nos imunossensores podem ser classificados em: eletroquímicos, eletromagnéticos: ópticos e piezelétricos. O transdutor a ser utilizado, juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um analito ou produto específico, não respondendo a outras substâncias presentes na amostra a ser analisada. A escolha de um determinado transdutor não depende apenas do elemento de reconhecimento selecionado, já que este determina quais variações das propriedades físico-químicas ocorreriam em função da interação, mas também de outros fatores como tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002; TANG et. al., 2006; WU et al., 2007).

#### 2.2.1.3 Transdutores Eletroquímicos

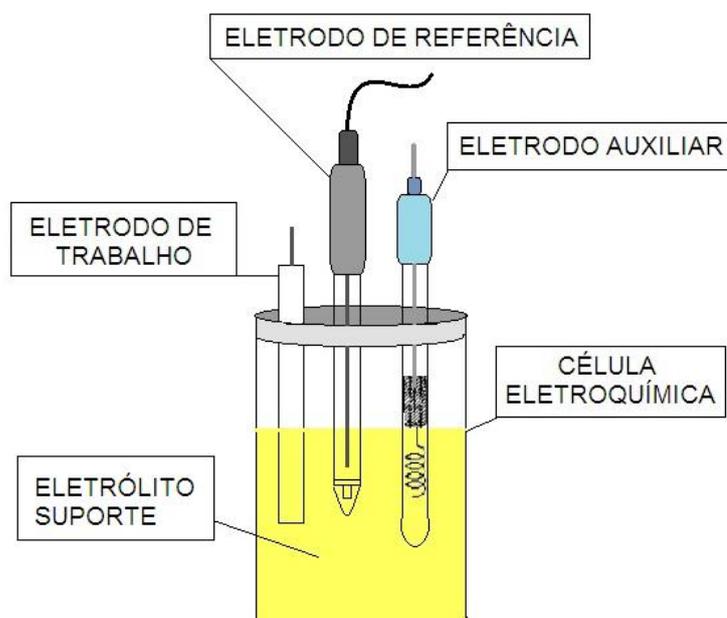
Os transdutores eletroquímicos oferecerem vantagens como simplicidade, rapidez na resposta, menor custo, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação de sensores portáteis (JIN et al., 2006).

Os imunossensores eletroquímicos têm como princípio básico a detecção de espécies eletroativas consumidas e/ou geradas durante o processo de interação do elemento biológico com seu substrato específico (MEHRVAR & ABDI, 2004). Esses sensores são projetados através da imobilização de moléculas biológicas à superfície eletródica (por exemplo, eletrodos de platina, ouro, prata, à base de carbono, grafite ou outros materiais condutores), que respondem ao aplicar impulsos elétricos (SADIK et al., 2009).

Em geral, os sistemas eletroquímicos são constituídos por um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de trabalho (Figura 5). Esses eletrodos são conectados a um potenciostato e imersos em uma célula contendo a solução da espécie eletroativa de

interesse com um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte), responsável por garantir o controle difusional das espécies (GANDRA et al., 2004). O eletrodo de referência, normalmente de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), mantém o potencial de trabalho estável. O eletrodo de trabalho funciona como elemento transdutor da reação antígeno-anticorpo, enquanto o eletrodo auxiliar estabelece uma conexão com a solução eletrolítica (GRIESHABER et al., 2008).

**Figura 5** - Sistema eletroquímico constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar (fio de platina) em uma célula eletroquímica com um eletrólito suporte.



FONTE: (Próprio autor).

### 2.3 NOVAS TENDÊNCIAS EM PLATAFORMAS SENSORAS

No processo de desenvolvimento de imunossensores, aspectos como a adaptação quanto ao tamanho e configuração, de modo que facilitem a coleta e análise do analito em campo, tem atraído bastante interesse. Outro aspecto que também tem chamado atenção é o desenvolvimento de plataformas sensoras descartáveis, devido à restrição ao uso prolongado de eletrodos à base de carbono convencionais e metálicos, que conseqüentemente levam a passivação ou degradação da superfície sensora necessitando de procedimentos de limpeza laboriosos. Dessa forma, é importante adaptação dos métodos tradicionais a sistemas

miniaturizáveis, de modo a facilitar o monitoramento remoto e diminuir os custos do diagnóstico (TSOUTI et al., 2011).

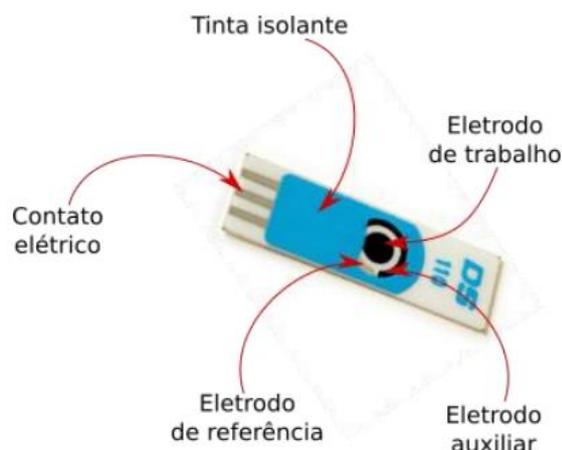
Atualmente, o uso de eletrodos impressos (SPEs, do inglês “*Screen-Printed Electrode*”) tem crescido e tornado-se popular por atender às demandas do mercado dos biossensores, particularmente devido à sua simplicidade e baixo custo (BERGAMINI et al., 2005; METTERS et al., 2011)

### **2.3.1 Eletrodos impressos**

Diferentes tipos de eletrodos tem sido usados como suporte de imobilização em imunossensores eletroquímicos. Dentre os quais, os eletrodos impressos (EIs) tem sido considerados como promissores devido a vantagens atrativas como possibilidade de miniaturização e facilidade de comercialização em larga escala. A tecnologia de confecção dos EIs é baseada na impressão de diferentes tintas condutoras sobre um suporte inerte. A praticidade em imprimir eletrodos com diferentes áreas e espessuras, aliada à facilidade para modificação da superfície sensora, podem promover o aumento na condutividade, área superficial e transferência de elétrons. Graças a essas vantagens, os EIs tem se destacado como uma das tecnologias mais vantajosas para elaboração de testes diagnósticos com dispositivos portáteis (WANG et al., 2008; TALEAT et al., 2014).

O uso de eletrodos impressos (EI) tornou-se bastante atraente para aplicações eletroanalíticas devido a incorporação do sistema convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), utilizado em diversas medidas eletroquímicas em um único suporte (Figura 6). Essa adaptação gerou um dispositivo com inúmeras vantagens em relação ao sistema convencional, tais como: dimensões reduzidas, portabilidade, de baixo custo e de mono-uso, o que evita problemas de contaminação da superfície (TALEAT et al., 2014).

**Figura 6** - Partes constituintes de um eletrodo impresso.



FONTE: (DROPSSENS, 2016)

Os EIs comerciais podem possuir diferentes formatos e configurações, de acordo com o fim pretendido. Alguns possuem modificação da superfície com nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanotubos de carbono (NTCs), grafeno, mediadores redox e fixação de enzimas. Essa modificação da superfície do eletrodo de trabalho é realizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade e conseguir obter limites de detecção cada vez menores (LI et al., 2012).

## 2.4 MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA

O desenvolvimento de técnicas de modificações de superfícies eletródicas tem sido importante por aumentar a estabilidade e reprodutibilidade dos imunossensores. Estas visam pré-estabelecer e controlar a reatividade da interface para imobilização de antígenos ou anticorpos, originando, frequentemente, respostas mais confiáveis do que na ausência do modificador (VENDRAME, 2004). Na modificação eletródica, a superfície do eletrodo pode ser propositadamente alterada por adsorção irreversível direta, por ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, por recobrimento com filmes poliméricos e nanomateriais (PEREIRA et al., 2002).

Filmes nanocompósitos têm atraído bastante interesse devido a sua capacidade de apresentar tanto propriedades pertencentes aos seus compostos isolados, como propriedades únicas, que não são observadas em seus componentes separadamente. Diversos materiais podem ser usados no desenvolvimento de filmes nanocompósitos, tais como: nanofios, nanopartículas, NTCs, nanoargilas, polímeros e etc (MEHL, 2011). Dentre os quais destacam-

se os NTCs, por apresentarem maior praticidade no processo de obtenção destes nanocompósitos.

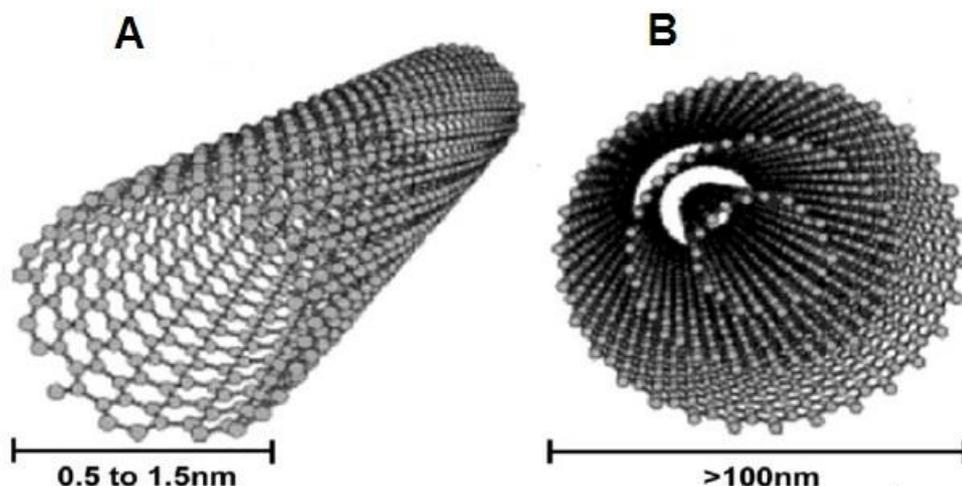
#### 2.4.1 Nanotubos de carbono

Os NTCs são nanomateriais excepcionais para aplicação nas mais diversas áreas de pesquisa, isso se deve às suas propriedades como condutividade elétrica, estabilidade química, resistência mecânica e alta área superficial (ZAGAL et al., 2012).

Os NTCs (Figura 6) são nanomaterias formados a partir de folhas de grafeno que podem se apresentar como:

- 1- nanotubos de paredes simples (SWCNTs, do inglês “*Single-Walled Carbon Nanotubes*”) quando são formados por apenas uma folha de grafeno e apresentam 0,75 a 3 nm de diâmetro e cerca de 50  $\mu\text{m}$  de comprimento.
- 2- NTCs de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês “*Multi-Walled Carbon Nanotubes*”) formado por múltiplas camadas de grafeno, exibindo um diâmetro médio de 2 a 100 nm, com uma distância entre as camadas concêntricas de grafeno de 0,42 nm. De um modo geral, os MWCNTs têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos do que os SWCNTs, isso se deve ao alto custo de obtenção dos SWCNTs e sua difícil manipulação (GAO et al., 2012; YANG et al., 2015).

**Figura 7** - Estrutura dos nanotubos de carbono (a) Nanotubo de paredes simples (b) Nanotubo de paredes múltiplas.



Fonte: (MACHADO et al., 2014) Adaptado.

Na eletroquímica, a utilização dos nanotubos é bastante difundida devido a suas propriedades eletrônicas que auxiliam nos processos de transferência de elétrons na superfície do eletrodo de trabalho. Quando funcionalizados, através de tratamento em meio ácido, para formação de vários grupos funcionais, tais como hidroxila, carbonila e carboxilas, passam a obter um aumento na estabilidade da suspensão, uma vez que os nanotubos de carbono apresentam dificuldades para dispersão em água ou solventes orgânicos (HAIDER et al., 2007; MORAES et al., 2009). Dessa forma, é possível assegurar maior reprodutibilidade na preparação do eletrodo de trabalho modificado, além de que, a funcionalização dos NTCs melhora a atividade catalítica e auxilia no processo de imobilização de biomoléculas para o desenvolvimento de diversos biossensores (ZHANG et al., 2008).

Diferentes espécies têm sido empregadas na modificação das propriedades dos nanotubos, essas modificações são utilizadas com a finalidade de ancorar biomoléculas, outros compostos, etc. Uma das possibilidades eletroquímicas para utilização de imunossensores sem a introdução de sondas redox, é a modificação de nanoestruturas com compostos que apresentem atividade catalítica. Neste trabalho, nanotubos de carbono foram conjugados à ftalocianinas de modo a explorar a atividade redox destas porfirinas, melhorando a atividade catalítica das nanoestruturas de carbono sobre a superfície sensora, bem como dispensando a necessidade da introdução de soluções contendo sondas redox, quando os imunossensores livres de marcação são desenvolvidos.

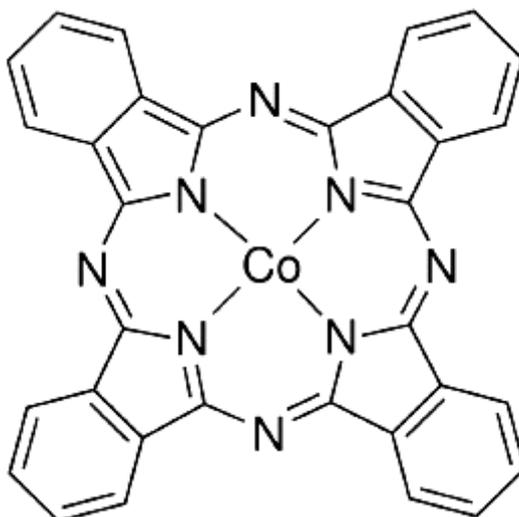
#### **2.4.2 Ftalocianina de Cobalto**

A combinação de ftalocianinas de cobalto (FtCo) com NTCs tem sido investigada no campo eletroanálise, principalmente pela possibilidade de associar propriedades interessantes para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A FtCo pode ser adsorvida fortemente sobre os NTCs e demais materiais à base de carbono, de forma que facilita a formação de compostos nanohíbridos de NTC-FtCo para diversos estudos, inclusive pesquisas com eletrocatalise (ZAGAL et al., 2012; APETREI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; DEVAENATHIPATHY et al., 2015).

Os primeiros relatos da ftalocianina surgiram em 1907, quando Braun e Tcherniac submeteram orto-cianobenzamida à altas temperaturas. Porém sua estrutura (Figura 7) só foi definida anos depois (LEZNOFF, 1989). As ftalocianinas possuem uma notável atividade catalítica, nas mais diversas reações eletroquímicas, além disso, são responsáveis pela

estabilidade do sistema por conta da sua redução, o que proporciona a formação de produtos que passavam a superfície do eletrodo. Quando em uso conjunto com NTC, podem oferecer excelentes propriedades catalíticas sem que haja perda nas propriedades eletrônicas dos nanotubos (MORAES et al., 2009; RAWAL et al., 2011).

**Figura 8** - Representação da estrutura química da ftalocianina de cobalto.



FONTE: (NASCIMENTO et al., 2013).

Os metais de transição têm sido intensivamente utilizados em reações catalíticas. Quando um eletrodo atua como oxidante ou redutor na geração de espécies ativas desse metal de transição e, essas mesmas espécies ativas catalisam a oxidação ou redução de determinadas espécies no meio da solução tem-se um processo eletrocatalítico. Na amperometria, devido a muitas reações no eletrodo que podem apresentar uma cinética desfavorável, há necessidade de aplicar-se um elevado sobrepotencial. A ftalocianina de cobalto melhora a atividade eletrocatalítica, diminuindo a resistência para a transferência de carga que, quando combinada com os NTCs, favorecem o aumento da sensibilidade da metodologia, o que contribui para aplicações analíticas (ZAGAL et al., 2012). Além de funcionar como catalizador ativo para diversas reações eletroquímicas, quando imobilizada na superfície de eletrodo, a FtCo pode sofrer processos redox de um modo rápido e com pouco gasto de energia. A FtCo também atua como mediador de elétrons para diversas moléculas, mantendo a eficiência da sua capacidade eletrocatalítica mesmo quando imobilizadas (BONI et al., 2011; ZAGAL et al., 2012).

Outra aplicação relevante das ftalocianinas está na formação de filmes, sejam filmes automontados (LbL, do inglês “*Layer-by-Layer*”), filmes Langmuir-Blodgett (LB), Langmuir-Schaefer, spin-coating, casting ou eletrodepositados (ZANFOLIM, 2010; YAHIA, 2012). Diversas aplicações da FtCo vêm sendo vistas na literatura, Gilbert e colaboradores (2010), desenvolveram um biossensor usando FtCo para detecção de fosfato em urina e amostras de água. Este biossensor apresentou bons resultados como melhora na sensibilidade do método. Sotomayor e colaboradores (2002), desenvolveram um biossensor amperométrico “livre de marcação” com o objetivo de detectar compostos fenólicos. O grupo desenvolveu um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina e histidina. O biossensor apresentou boas características como boa sensibilidade, tempo de resposta de 3 segundos e tempo de vida de 50 dias.

Geraldo e colaboradores (2008), desenvolveram um biossensor modificado com NTCs e FtCo para catalisação da eletro-oxidação da hidrazina. Este sistema demonstrou melhora na atividade catalítica do processo de oxidação da hidrazina, sem alteração no mecanismo da reação. Este eletrodo modificado com NTC e FtCo também apresentou diminuição da resistência na transferência de elétrons, confirmando assim o efeito sinérgico do filme.

Dejane e colaboradores (2015) desenvolveram um biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. A modificação do eletrodo consistiu na imobilização de NTCs de paredes múltiplas, nanopartículas de ouro, FtCo e enzima tirosinase em um eletrodo de carbono vítreo. O presente trabalho descreveu um biossensor estável, sensível e reprodutível com limite de detecção compatível com os valores estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Os exemplos mencionados anteriormente, evidenciaram as vantagens em se utilizar um filme nanocompósito de NTC e FtCo no desenvolvimento de biossensores, devido às características como eletrocatalise, alta área superficial, fácil preparação, possibilidade de miniaturização e facilidade de imobilização de outros modificadores (nanopartículas, polímeros, biomoléculas e sondas de DNA).

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE SENSORA

### 2.5.1 Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo. A eletroquímica pode favorecer opções viáveis para mediar problemas na construção de novos métodos para o diagnóstico clínico. Uma das vantagens é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas, além do fácil controle de variáveis que combinadas de formas diversas levam as técnicas eletroquímicas particulares, tais como: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de pulso diferencial (VPD) (BRETT & BRETT, 1993).

A obtenção das informações do analito serão obtidas através da medição da magnitude da corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar após a aplicação de um 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 é uma das mais indicadas para caracterização das plataformas sensoras, pois permite acompanhar as etapas de modificação da superfície eletródica em função dos parâmetros elétricos (densidade de corrente, capacitância, resistência, entre outros). Neste tópico, as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de varredura linear usadas na elaboração do imunossensor proposto serão fundamentadas.

#### 2.5.1.1 Voltametria Cíclica

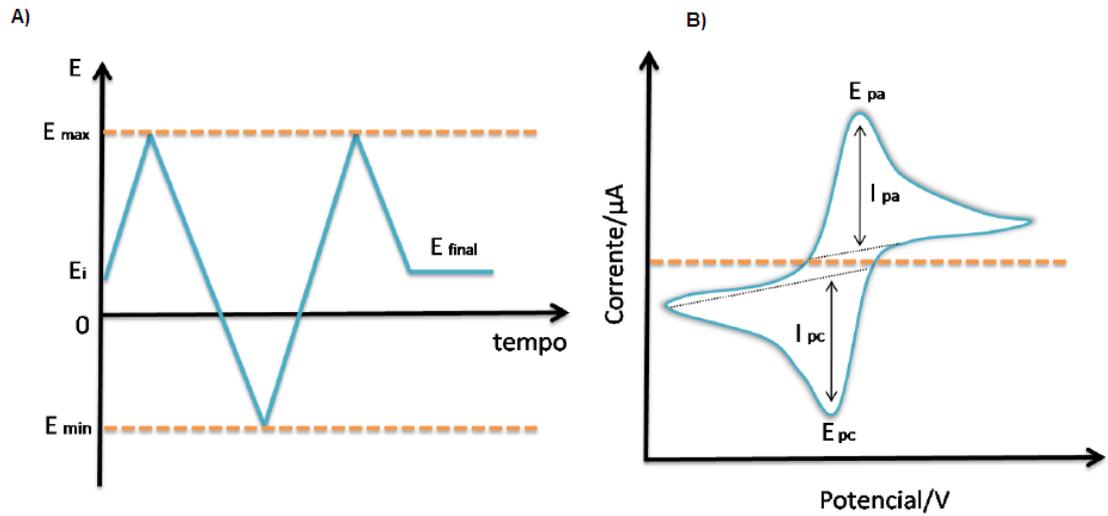
A versatilidade e facilidade de aplicação são os principais fatores que tornam a técnica de VC popularizada entre as diversas áreas de aplicação. Geralmente, é a primeira técnica a ser realizada quando se quer estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície de um eletrodo, pois a mesma permite conhecer o comportamento redox de um sistema em grande intervalo de potenciais. Parâmetros, como corrente e potenciais de pico anódico e catódico, são importantes para a caracterizar um sistema quanto à sua reversibilidade e analisar a ocorrência de reações acopladas ao processo do eletrodo (BARD & FAULKNER, 2001; LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

A VC é bastante utilizada principalmente quando se busca obter informações qualitativas de um processo do eletrodo. O método pode se tornar impreciso para análises quantitativas, devido ao tipo de resposta na forma de ondas. Embora, recentes trabalhos apontem o sucesso no uso da VC para medidas quantitativas (TICIANELLI & GONZALEZ, 2013).

A VC é um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre o analito são mensuradas através de variações de corrente resultantes de reações de redução e oxidação durante a aplicação de uma diferença de potencial sobre o eletrodo de trabalho. Nesse processo, uma corrente capacitiva é gerada, relacionada a alterações na dupla camada do eletrodo após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes faradáicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox de espécies eletroativas (BARD & FAULKNER, 2006; BRETT & BRETT, 1993). Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

A resposta em corrente na VC pode ser obtida quando o eletrodo de trabalho é submetido a uma onda triangular de potencial, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Como resultado, é gerado um gráfico de corrente em função da variação do potencial, denominado voltamograma cíclico. Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico ( $E_{pc}$ ) e anódico ( $E_{pa}$ ), e as correntes de pico catódico ( $I_{pc}$ ) e anódico ( $I_{pa}$ ) (Figura 8) (HOLLER et al., 2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons. Para uma reação reversível, as  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  são aproximadamente iguais em valor absoluto, a diferença entre os  $E_p$  é aproximadamente 59 mV e  $E_p$  é independente da velocidade de varredura. Já nos sistemas irreversíveis observa-se uma completa ausência de picos de oxidação e redução reversos e deslocamentos do  $E_p$  em relação à velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

**Figura 9** - 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  $E_{pc}$ .

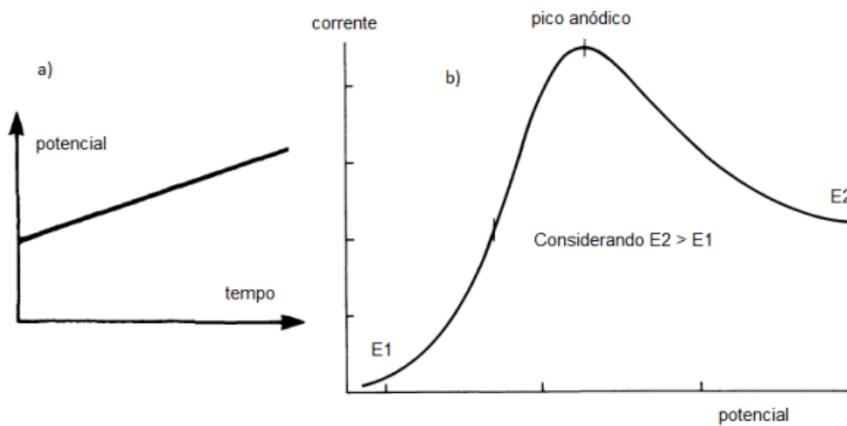


FONTE: Adaptado de BREET & BREET, 1993.

### 2.5.1.2 Voltametria de Varredura Linear

Na técnica de voltametria de varredura linear o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente em função do tempo (Figura 9), nessa técnica é possível aplicar velocidades de varredura relativamente altas (até  $1000 \text{ mV/s}^{-1}$ ) (BAREK et al., 2001).

**Figura 10** - Representação esquemática da voltametria com varredura linear: a) Variação do potencial em função do tempo, b) variação da corrente em função do tempo.



FONTE: BAREK et al., 2001.

A corrente é medida de forma direta, em função do potencial aplicado, desta forma a corrente total medida possui contribuições tanto da corrente faradáica quanto da corrente capacitiva.

## 2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DE SUPERFÍCIES EM BIOSENSORES

### 2.6.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

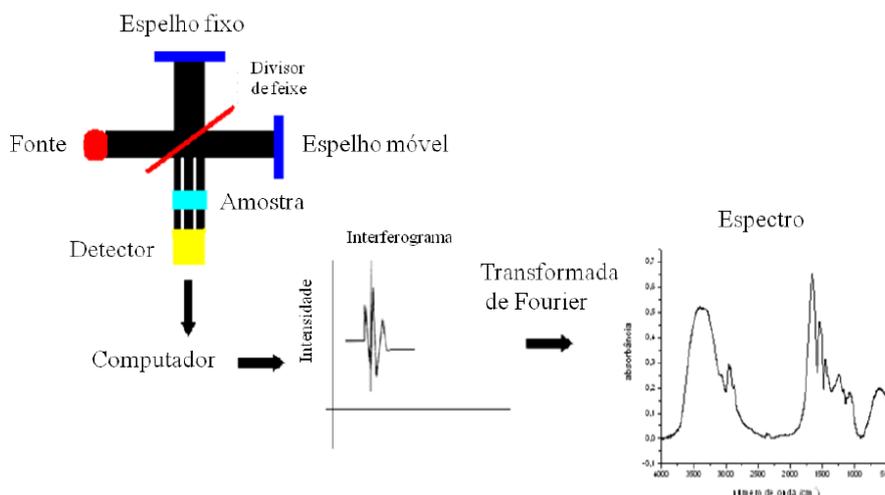
Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura e morfologia de superfícies nanoestruturadas em biossensores. As mais utilizadas são: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, “*Fourier Transform InfraRed Spectroscopy*”), difração de raios X (DRX), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica óptica usada para análise química de superfícies, tendo como princípio a detecção da radiação absorvida pelas ligações moleculares de diferentes materiais. No momento em que a radiação infravermelha incide numa molécula, provoca excitação dos seus grupos químicos em modos vibracionais. Dessa forma, quando a energia radiada corresponde ao mesmo nível energético vibracional da molécula em análise, a luz é absorvida (GRIFFITHS, 2007; ALBERT et al., 2011).

O espectro de absorção de cada molécula é único, funcionando como uma impressão digital. É possível caracterizar as amostras a partir do conhecimento da localização das bandas de absorção de cada grupo químico, e se conhecida a intensidade das bandas também pode ser possível determinar a concentração dos seus constituintes. O espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier é composto por uma fonte de radiação na região do infravermelho, um interferômetro com um espelho móvel, um detector, um conversor analógico/digital e um computador (Figura 11). A luz da fonte do espectrofotômetro incide sobre o interferômetro, que separa a mesma em dois feixes, um incide sobre um espelho fixo e outro incide sobre um espelho móvel. Os feixes de luz refletidos pelo espelho móvel e fixo se sobrepõem. Este feixe de luz sobreposto passa pela amostra incidindo no detector. O espectro detectado não pode ser diretamente interpretado, necessitando ser reconstruído por aplicação

da transformada de Fourier. Os dados tratados representam a relação da absorvância (ou transmitância) da ligação dos grupos químicos vs. a frequência ou número de onda. De acordo com a amostra, o espectro pode ser medido em modo de transmitância ou de refletância (FOSCHINI, 2009).

**Figura 11** - Esquema do princípio de um espectrômetro de FTIR na geração de um espectro.



FONTE: (FORATO et al., 2010).

## 2.7 BIOSSENSORES PARA BNP

A utilização de biossensores aplicados à detecção do BNP ainda é algo bastante restrito, de modo que poucos estudos foram desenvolvidos. Matsuura e colaboradores (2005) desenvolveram um imunensaio enzimático eletroquímico para determinação do BNP, com tempo médio de resposta de 60 minutos. Nesse estudo o BNP foi adicionado a uma solução anti-BNP marcada com acetilcolinesterase. Após a interação imunológica, dois métodos foram empregados, o primeiro para medir a quantidade de enzima-anticorpo reagido e o segundo para medir a quantidade de enzima-anticorpo reagido com pelo menos com uma ligação livre. Em seguida, a quantidade de conjugado reagido ou não reagido foi determinada medindo a atividade da enzima a partir da mistura reacional imunológica. Este sistema eletroquímico apresentou um limite de detecção de 10 ng L<sup>-1</sup> para o BNP.

Em 2012, Lee e colaboradores desenvolveram um biossensor de nanofio de polianilina específico para um único local (PANI) com boa sensibilidade e especificidade, capaz de detectar mioglobina, troponina I, CK-MB e BNP, biomarcadores cardíacos importantes para o diagnóstico de doenças cardiovasculares. Tal biossensor foi baseado na utilização de nanofios

de PANI únicos, integrados com canais microfluídicos, que apresentaram resposta rápida e eficiência superior para detecção de biomoléculas livre de marcadores. Além disso, foram detectadas baixas concentrações de Myo (100 pg / mL), cTnI (250 µg / mL), CK-MB (150 µg / mL) e BNP (50 µg / mL).

Shanmugam e colaboradores (2018), desenvolveram um sensor eletroquímico para detecção de BNP, cTnI e cTnT, com nanoestruturas de ZnO anisotrópico, utilizando métodos hidrotérmicos de baixa temperatura. Além da aferição analítica, foi realizada a espectroscopia de Impedância e outras técnicas eletroquímicas. Este biossensor apresentou resposta linear nos testes séricos humanos de 1pg / mL-100 ng / mL e LOD de 1 pg / mL.

Embora tenham sido desenvolvidas algumas pesquisas aplicando biossensores para a detecção do BNP, muito ainda precisa ser feito para que possam ser disponibilizados no mercado biossensores sensíveis, específicos e com detecção em tempo real, que consigam realizar este procedimento em amostras de soro e sangue total.

### **3 PEDIDO DE PATENTE**

**Pedido de patente:** *Submetida ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Brasil, em 12/04/2018 com número do processo: BR 10 2018 007403 2.*

Titulo da Invenção: **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR NANOESTRUTURADO APLICADO AO DIAGNÓSTICO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA PELA DETECÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO – B (BNP) LIVRE DE Sonda REDOX**

**Autores:**

Vicente de Paulo dos Anjos Landim

Rosa Amália Fireman Dutra

Bárbara Virgínia Mendonça da Silva

**Depositante:**

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Co-depositário:**

Rosa Amália Fireman Dutra

### **Resumo**

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO APLICADO AO DIAGNÓSTICO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA PELA DETECÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO – B (BNP) LIVRE DE SONDA REDOX.

A presente invenção trata-se de um filme nanocompósito de nanotubos de carbono funcionalizados com ftalocianina de cobalto para desenvolvimento de imunossensor livre de marcação e sonda redox para detecção do Peptídeo natriurético tipo-B (BNP) com aplicação na área de biotecnologia voltada para a melhoria da saúde e qualidade de vida visando proporcionar um melhor diagnóstico da insuficiência cardíaca, de forma rápida, simples, segura e de baixo custo. A otimização das condições experimentais forneceu uma reta de calibração para as diferentes concentrações de BNP do imunossensor proposto, demonstrando que o sistema apresentou boa linearidade com  $r=0,996$  ( $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ), apresentando um limite de detecção de 3,3 pg/mL, com uma faixa linear de 10 pg/mL a 1000 pg/mL. Os estudos eletroquímicos desenvolvidos comprovaram a eficiência da FtCo em mediar a transferência de elétrons diretamente na interface sensora, dispensando o uso de um eletrólito com propriedades redox. O filme nanocompósito de NTC-FtCo-EDA demonstrou propriedades desejáveis, tais como estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade para a biomolécula testada.

**Desenvolvimento De Um Filme Nanoestruturado A Base Nanotubos De Carbono  
Funcionalizados Com Ftalocianina De Cobalto Para Aplicação Em Imunossensor Para  
Detecção Do Peptídeo Natriurético Tipo – B (Bnp) “Livres De Sonda Redox”**

[001] A presente invenção um dispositivo sensor eletroquímico amperométrico por voltametria linear (VL) para detecção do peptídeo natriurético do tipo B (BNP), a partir de amostras biológica de origem humana, baseado na atividade eletrocatalítica do nanocompósito ftalociana de cobalto (FtCo) e nanotubos de carbono (NTC), dispensando o uso de soluções redox adicionais nas etapas de medidas.

[002] Atualmente, a insuficiência cardíaca (IC) configura um dos grandes problemas de saúde pública. A mesma está associada a sérios desfechos como internação hospitalar e morte. Embora os novos tratamentos tenham reduzido o número de óbitos por IC, as internações hospitalares por esses eventos continuam a acontecer em grande escala. Geralmente, pacientes internados com IC têm uma taxa de mortalidade de 15% e uma taxa de rehospitalização que pode chegar a 40%, podendo ocorrer em até 6 meses após a alta.

[003] A conduta da equipe de saúde logo na chegada do paciente à emergência tem papel fundamental na recuperação deste paciente e impacto direto sobre a morbidade e mortalidade. Ao suspeitar que o paciente está sofrendo de IC, após a realização do exame clínico, é necessário recorrer a outras formas de diagnóstico para assegurar a presença da lesão cardíaca. Para o diagnóstico da IC, os exames considerados de primeira linha são: o eletrocardiograma, o Raio-X e a dosagem do BNP. Com o objetivo de contribuir para acurácia diagnóstica da IC na rotina hospitalar, ressalta-se a importância dos biomarcadores, principalmente do BNP.

[004] A liberação do BNP ocorre em resposta ao aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo e ao estresse parietal diastólico final desse ventrículo. Os níveis séricos do BNP são utilizados tanto para diagnosticar a IC quanto para avaliar prognóstico de pacientes já diagnosticados (JORGE et al., 2013).

[005] Níveis altos de BNP estão associados a pior evolução do paciente, bem como maior tempo de internação e altos índices de mortalidade, quanto mais alto o valor do BNP, pior será o prognóstico do paciente (PEREIRA-BARRETTO et al., 2013).

[006] Com a dosagem do BNP é possível excluir um diagnóstico quando a causa não for cardíaca, isso contribui para uma melhor investigação, bem como redução de custos com exames adicionais como o eletrocardiograma e a ecocardiografia em pacientes com níveis de BNP abaixo do ponto de corte (ROBERTS et al., 2015).

[007] A dosagem do BNP é altamente específica para o diagnóstico da IC. Dessa forma, alguns valores são usados como referência. A Agência Internacional Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, do “inglês” *Food and Drug Administration*) determina um limite clínico de concentração do BNP para decisão de exclusão no diagnóstico de IC. Segundo a FDA, pacientes com níveis menores que 100 pg/mL tem o diagnóstico da IC descartado. Valores entre 100 e 200 pg/mL de BNP estão em uma zona cinza, sugerida como um valor intermediário e de precisão diagnóstica para IC. Nesta situação, um ponto crucial será o julgamento da história clínica do paciente que assumirá um importante papel na tomada de decisão pela equipe de saúde. Valores iguais ou maiores que 400 pg/mL servem como confirmação de diagnóstico da IC, com exceção dos pacientes acima de 75 anos onde o diagnóstico deve ser mais criterioso devido ao aumento normal nos níveis de BNP em pessoas com idade avançada (COSTE et al., 2006; MAISEL et al., 2008).

[008] Na prática laboratorial, para a detecção do BNP se utiliza principalmente os métodos de imunoenaios em placa, que empregam de marcadores enzimáticos e fluorescentes para quantificação indireta do BNP em amostras humanas. Porém esses imunoenaios são demorados (podendo durar cerca de 5h) e possuem um alto custo, inviabilizando sua aplicação num rápido sistema de pronto atendimento. Novos métodos para detecção do BNP baseados em sistemas de biossensores têm superado desafios em termos de sensibilidade e rapidez diagnóstica nos últimos anos.

[009] Biossensores são dispositivos eletrônicos que possibilitam detectar e quantificar componentes biológicos, denominados por analitos, como diversos tipos de proteínas, enzimas ou anticorpos, tendo como base um transformador de sinal (eletroquímico, óptico, etc.) que irá quantificar o sinal e posteriormente com o auxílio de software para obter o resultado. As moléculas detectadas pelos biossensores são conhecidas como biomarcadores e caracterizam-se por indicar uma alteração do estado fisiológico do indivíduo, sendo assim, utilizados para o diagnóstico ou monitorização de doenças (MALON et al., 2014; MAES et al., 2015).

[010] Em relação ao tipo de resposta pretendida, os imunossensores são classificados como marcados e não marcados. Os ensaios marcados descritos na literatura exploram o princípio do imunoenasão do tipo competitivo e sanduíche que utilizam nanopartículas, enzimas e fluoróforos como marcadores. Embora seja seletivo, este método implica em elevados custos operacionais, bem como o aumento das etapas de processamento da amostra (RAPP et al., 2010; GOPINATH et al., 2014).

[011] Nos ensaios livres de marcação (“*label-free*”), a resposta do imunossensor é obtida diretamente após o evento de biorreconhecimento. Essa resposta analítica é proveniente de uma sonda redox imobilizada no próprio filme (eletrodo de trabalho) ou dissolvida em solução. Existem inúmeras vantagens do uso de sistemas não marcados sobre as técnicas rotuladas, como protocolos mais rápidos, reduzindo o sinal de fundo e níveis mais elevados de sensibilidade (LIANG et al., 2011).

[012] Lee e colaboradores (2012), desenvolveram biossensores baseados em nanofios de polianilina, integrados a canais microfluídicos para a detecção específica de BNP em baixas concentrações (50 fg/mL) foi realizada monitorando a mudança de condutância nos nanofios utilizando sistemas de microfluídica para detecção do BNP.

[013] Kurita e colaboradores (2006), demonstraram o desenvolvimento de um biossensor usando um sistema de microfluídica para detecção do BNP com baixos limites de detecção (faixa de concentração detectável de 5 pg/mL-100 ng/mL). Devido a sua maior complexidade, os custos dos dispositivos microfluídicos são maiores do que os biossensores convencionais.

[014] Jang e colaboradores em 2014, utilizaram o método ótico de ressonância de plasmóns de superfície (SPR) para detecção do BNP através de um sistema marcado (ensaio do tipo sanduíche) obtiveram baixos limites de detecção. Em 2017, Lei e colaboradores desenvolveram um biossensor de transistor de efeito de campo de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de platina, acoplado com um sistema de microfiltro para detecção de BNP livre de marcação e com boa sensibilidade.

[015] O documento EUA 20030022235, possui métodos para determinar o prognóstico de pacientes já diagnosticados com IC ou outras doenças cardiovasculares. O método inclui a identificação de um nível de BNP que estará relacionado a um aumento nos sintomas associados à doença cardiovascular do paciente através de um transistor de efeito de campo nanofixo implantado no paciente.

[016] O documento WO 2011153127 A1, trata da integração de sensores e ensaios de biomarcadores para detectar piora da insuficiência cardíaca. O mesmo revela o uso de dados fisiológicos combinados à detecção de biomarcadores para avaliar o quadro de pacientes com insuficiência cardíaca através de sensores implantáveis que conseguem avaliar a variação do BNP em níveis como 100 pg/ml.

[017] Embora alguns imunossensores tenham sido desenvolvidos para detecção do BNP, poucos foram testados em amostras de soro ou sangue total. Dessa forma, biossensores sensíveis e específicos para detecção do BNP que consigam detecta-lo em amostras de soro e

sangue total são altamente desejados, para que ocorra o monitoramento em tempo real e o mesmo possa ser quantificado antes que os sintomas possam aumentar (YONG-MIN et al, 2017).

[018] Atualmente, não existem imunossensores eletroquímicos para detecção rápida e direta do BNP livre de marcação e sonda redox. A presente invenção se destaca como uma inovação no campo dos biossensores pelo desenvolvimento de um filme nanocompósito de NTC-FtCo que dispensa o uso de uma sonda redox em solução para realização das leituras eletroquímicas. Dessa forma, com esse filme foi possível desenvolver um imunossensor com capacidade para detectar o BNP em poucos segundos e com baixos limites de detecção (3 pg/mL).

[019] É portanto, objeto da presente invenção o processo de desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico a base de um filme nanocompósito de NTC-FtCo para a detecção do BNP em um sistema livre de sonda redox para aplicação no diagnóstico em tempo real da IC, compreendendo as etapas de:

[020] a. Processo de funcionalização dos nanotubos de carbono com a ftalocianina de cobalto;

[021] b. Construção de um filme nanocompósito composto de nanotubos de carbono funcionalizados com ftalocianina de cobalto e recobertos com etilenodiamina (EDA) 15%;

[022] c. Imobilização orientada do anticorpo anti-BNP;

[023] d. Bloqueio dos sítios reativos inespecíficos com uma solução de glicina 100mM (pH 9.0);

[024] e. Curva de calibração com diferentes concentrações de BNP (10 pg/mL; 100 pg/mL; 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL e 1000 pg/mL);

[025] f. Curva de soro com diferentes diluições do soro enriquecido com BNP (1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64) a partir da concentração inicial de 1000 pg/mL.

[026] A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo, onde:

[027] A **FIGURA 1**, representa o princípio de operação de um imunossensor;

[028] A **FIGURA 2**, representa o esquema da construção do filme nanocompósito de NTC-FtCo; No qual foram usados nanotubos de carbono previamente funcionalizados com ftalocianina de cobalto na concentração de 2 mg de NTC/1 mg FtCo dispersados em 1 mL de DMF e sonicados por 60 minutos. Após essa etapa os nanotubos funcionalização foram lavados por 5 vezes para retirar o excesso de FtCo, garantindo que o sinal demonstrado nas leituras eletroquímicas é proveniente da FtCo funcionalizada no filme. Para formação do

filme foram realizadas 5 deposições de 5  $\mu$ L da solução de NTC-FtCo sobre o eletrodo impresso (EI) de carbono da dropsens. O EI foi levado para secar em estufa a 50°C por 15 minutos entre as deposições.

[029] A **FIGURA 3**, representa a construção do imunossensor a partir do filme nanocompósito de NTC- FtCo-EDA. Após a formação do filme de NTC-FtCo foi realizada a deposição de 10  $\mu$ L de uma solução de EDA (15%) durante 60 minutos. Em seguida o eletrodo de trabalho foi lavado para retirar o excesso de EDA. A solução de anticorpos Anti-BNP foi incubada durante 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Os sítios livres não-específicos do anti-BNP foram bloqueados utilizando uma solução de glicina (100mM; pH 9,0) durante 60 minutos. Após esta etapa, os EIs foram incubados com soluções de diferentes concentrações de BNP (10 pg/mL; 100 pg/mL; 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL e 1000 pg/mL) diluídas em PBS (10 mM; pH 7,4).

[030] A **FIGURA 4**, representa um estudo de concentração de FtCo em relação aos NTCs. No qual, foram testadas três concentrações: 0,25 mg/mL de FtCo, 0,5 mg/mL de FtCo e 1 mg/mL de FtCo para 2 mg/mL de NTC dispersos em dimetilformamida (DMF). As leituras eletroquímicas foram realizadas por meio da técnica de voltametria cíclica (VC) em um sistema trieletródico usando uma célula eletroquímica contendo uma solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$  /  $K_4[Fe(CN)_6]$  (0,005 M) preparado em KCl (0,1M). A concentração escolhida foi a de 2mg/ml de NTC para 1 mg/ml de FtCo por apresentar o maior aumento de corrente em relação aos demais;

[031] A **FIGURA 05**, representa a influência da concentração de EDA. Foram usadas as seguintes concentrações: 2%, 5%, 10%, 15% e 20%. A concentração ótima para trabalho foi a de 15%, pois a mesma possibilitou a imobilização dos anticorpos anti-BNP sem que houvesse o bloqueio do sinal da FtCo. As medidas foram obtidas através de análises por VC em solução de KCl 0,1 M;

[032] A **FIGURA 06**, representa a caracterização estrutural por FTIR, em A) NTCs, B) FtCo, C) NTC-FtCo e em D) NTC-FtCo-EDA. Conforme pode ser observado, a atribuição apresentada na figura deixa evidente a natureza da FtCo quando comparados aos valores de referência estabelecidos por Verma e cols (2008). São observados picos e bandas similares aos observados para o NTC bem como para a FtCo e EDA o que indica claramente que o nanocompósito é constituído de NTC-FtCo-EDA.

[033] A **FIGURA 07**, representa o ensaio de estabilidade do filme de NTC- FtCo-EDA realizando-se 20 sucessivas varreduras usando a técnica de VC do mesmo eletrodo, na janela

de potencial -0,8 a 0,6 V vs. Ag/AgCl (KCl Sat.), sob velocidade de varredura de 100 mV/s, em solução de KCl (0,1 M). A estabilidade do filme NTC- FtCo-EDA no EI foi avaliado a partir do conhecimento do coeficiente de variação (CV) do pico catódico com o valor de 0,6174% obtido entre os experimentos;

[034] A **FIGURA 08**, representa a transferência de elétrons na interface sensora modificada com o filme de NTC- FtCo-EDA avaliada submetendo o eletrodo a leituras em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV/s). De acordo com os voltamogramas cíclicos (CVs) obtidos na Figura 07, os potenciais dos  $I_{p_a}$  e  $I_{p_c}$  não variaram em função da velocidade de varredura selecionada para o estudo. Estes resultados demonstram que o filme apresentou boa reversibilidade eletroquímica. Os valores em corrente dos picos redox em relação à raiz quadrada das velocidades de varredura, apresentados no *inset* da Figura 07, variaram proporcionalmente, sugerindo um processo controlado por difusão.

[035] A **FIGURA 09**, representa a influência das diferentes concentrações de anti-BNP (1/5.000; 1/8.000; 1/10.000; 1/25.000 e 1/50.000) imobilizado sobre o filme de NTC- FtCo-EDA. As medidas foram obtidas através de análises por VC em solução de KCl 0,1 M.

[036] A **FIGURA 10**, representa as etapas de construção da plataforma sensora através da técnica de VC. Em a) Eletrodo não modificado, b) eletrodo modificado com um filme de NTC- FtCo, c) eletrodo modificado com um filme de NTC- FtCo-EDA, d) eletrodo modificado com um filme de NTC- FtCo-EDA /Anti-BNP, e) eletrodo modificado com um filme de NTC- FtCo-EDA /Anti-BNP/glicina.

[037] A **FIGURA 11**, representa a curva de calibração do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de BNP (10 pg/mL; 100 pg/mL; 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL e 1000 pg/mL) diluídas em PBS (10 mM; pH 7,4). Varreduras realizadas em solução de KCl 0,1M por meio da técnica de VL.

[038] **FIGURA 12**, representa Curva de soro do imunossensor, obtida através da leitura de eletrodos contendo soro enriquecido com BNP e soro não enriquecido como controle negativo nas seguintes diluições: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64 diluídas em PBS (10 mM; pH 7,4). A concentração inicial do soro enriquecido era de 1.000 pg/mL. As varreduras realizadas em solução de KCl 0,1M por meio da técnica de VL.

[039] Com relação a estas figuras, pode-se observar (**Figura 3**) que o eletrodo impresso (EI) foi inicialmente modificado com uma solução de NTC-FtCo. Após a deposição da solução, o filme foi seco em estufa a 50°C durante 15 minutos. Em seguida, o filme foi submetido a encubação em uma solução de EDA 15% por 60 minutos (**Figura 4**).

[040] A modificação do eletrodo com NTC-FtCo-EDA contribuiu para a formação de um

filme estável e reproduzível eletroquimicamente (**Figura 7**).

[041] Os grupos amino funcionais da etilenodiamina foram explorados para imobilização orientada dos anticorpos anti-BNP em uma concentração de 1:10.000 durante 60 minutos (**Figura 8**). Após a imobilização dos anticorpos, Os sítios ativos remanescentes do eletrodo foram bloqueados com uma solução de glicina 100mM (pH 9.0) durante 60 minutos. Após esta etapa, os EIs foram incubados com soluções de diferentes concentrações de BNP diluídas em PBS (pH 7,4; 10 mM) (**Figura 10**). Entre as etapas do imunoenensaio a superfície eletródica foi lavada cuidadosamente com tampão PBS (pH 7,4; 10 mM).

[042] Para caracterização das etapas de modificação do EI análises por VC foram realizadas em  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (5 mM) preparado em KCl (100 mM). Os voltamogramas do ECV foram obtidos na faixa de potencial de -0,8 a 0,6 V *vs.* Ag/AgCl ( $KCl_{Sat.}$ ), a velocidade de varredura de 100 mV/s. A interação antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo foi monitorada em tempo real, utilizando a técnica eletroquímica de VL. A resposta analítica para BNP foi obtida pela diferença entre a altura dos picos de corrente ( $\Delta I$ ) da VL do ECV com a BNP em relação ao branco, ou seja, antes da incubação com BNP.

[043] A otimização das condições experimentais forneceu uma reta de calibração para as diferentes concentrações de BNP (10 pg/mL; 100 pg/mL; 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL e 1000 pg/mL) do imunossensor proposto, demonstrando que o sistema apresentou boa linearidade com  $r=0,996$  ( $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ), apresentando um limite de detecção de 3,3 pg/mL (**Figura 11**).

[044] Os estudos eletroquímicos desenvolvidos comprovaram a eficiência da FtCo em mediar a transferência de elétrons diretamente na interface sensora, dispensando o uso de um eletrólito com propriedades redox. O filme nanocompósito de NTC-FtCo-EDA demonstrou propriedades desejáveis, tais como estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade para a biomolécula testada.

## **Bibliografia**

ALMEIDA, J. et al. Avaliação hemodinâmica não invasiva na IC. Arquivos Brasileiros de Cardiologia., v. 98, n. 1, p. 15-21, 2012.

REDFIELD, et al. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. JAMA. (2), 289:194-202, 2003.

COLLINS, S. et al. Early Management of Patients with Acute Heart Failure: state of the art and future directions. A consensus document from the Society for Academic Emergency Medicine/Heart Failure Society of America Acute Heart Failure Working Group. Journal of Cardiology Heart Failure, v. 21, n. 1, p. 27-43, 2015.

KELDER, J. C. et al. Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. *Heart.*, v. 97, n. 1, p. 959-963, 2011.

LAGOEIRO-JORGE, A. J. et al. Utilidade do doseamento do peptídeo natriurético tipo B em doentes ambulatoriais com insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada. *Revista Portuguesa Cardiologia*, v. 32, n. 9, p. 647-652, 2013.

PEREIRA-BARRETTO, A. C. et al. Papel dos Níveis de BNP no Prognóstico da Insuficiência Cardíaca Avançada Descompensada. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 100, n. 3, p. 281-287, 2013.

MALON, R. S. P., Sadir, S., Balakrishnan, M., & Córcoles, E. P. (2014). Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *BioMed Research International*, 2014(i), 1–20. <http://doi.org/10.1155/2014/962903>

MAES, E., Mertens, I., Valkenborg, D., Pauwels, P., Rolfo, C., & Baggerman, G. (2015). Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.07.006>

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.

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

R. Kurita, Y. Yokota, Y. Sato, F. Mizutani, and O. Niwa, *Anal. Chem.*, 78, 5525 (2006).

VERMA, D.; DASHA, R.; KATTI, K.S.; SCHULZ, D.S.; CARUSO, A.N. Role of coordinated metal ions on the orientation of phthalocyanine based coatings. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 70, p. 1180-1186, 2008.

### Reivindicações

#### **DESENVOLVIMENTO DE UM FILME NANOESTRUTURADO A BASE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM FTALOCIANINA DE COBALTO PARA APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO – B (BNP) “LIVRE DE SONDA REDOX”**

1. Imunossensor eletroquímico para detecção direta do peptídeo natriurético do tipo B **caracterizado por** um filme nanocompósito a base de nanotubos de carbono funcionalizados com ftalocianina de cobalto que possibilita a realização da análise “livre de sonda redox”.
2. O desenvolvimento de um filme nanocompósito **caracterizado por** nanotubos de carbono carboxilados de paredes múltiplas previamente funcionalizados com ftalocianina de cobalto e recobertos por uma camada de etilenodiamina.
3. Processo de funcionalização dos nanotubos de carbono com ftalocianina de cobalto **caracterizado por** concentrações de 2/1 (2mg/ml de NTC para 1mg/ml de FtCo), 3/1(3mg/ml de NTC para 1mg/ml de FtCo), 4/1 (4mg/ml de NTC para 1mg/ml de FtCo) e 5/1 (5mg/ml de NTC para 1mg/ml de FtCo), caracterizado pela dispersão dos mesmos em dimetilformamida e sonicados durante 60 minutos. Bem como o processo de lavagem dos nanotubos em centrifuga a 15.000 rpm por 10 minutos, após a centrifugação despreza-se o sobrenadante e resuspende os nanotubos funcionalizados com ftalocianina em DMF. Repetir esse procedimento por 5 vezes até que a solução de NTC-FtCo esteja com aparência limpa.

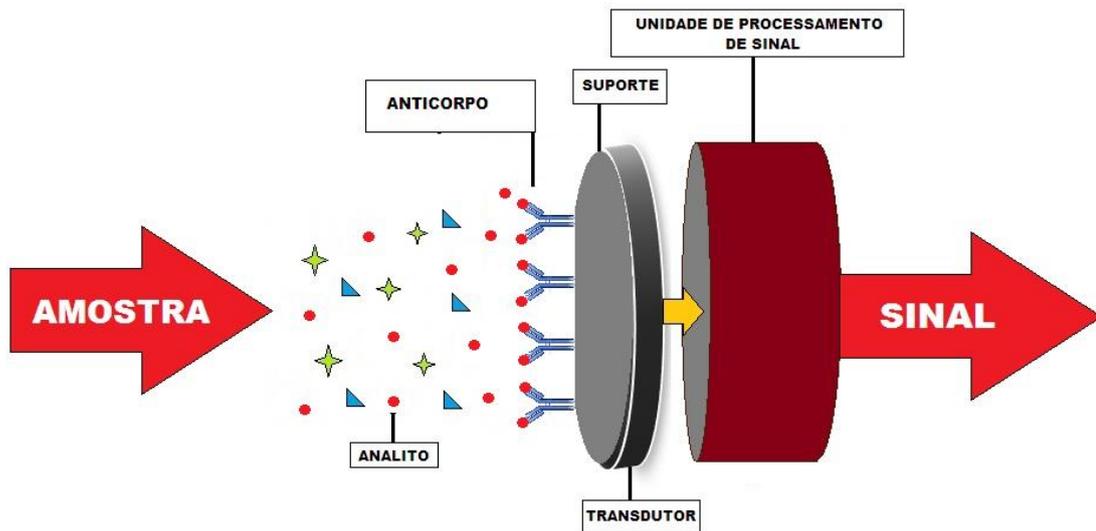
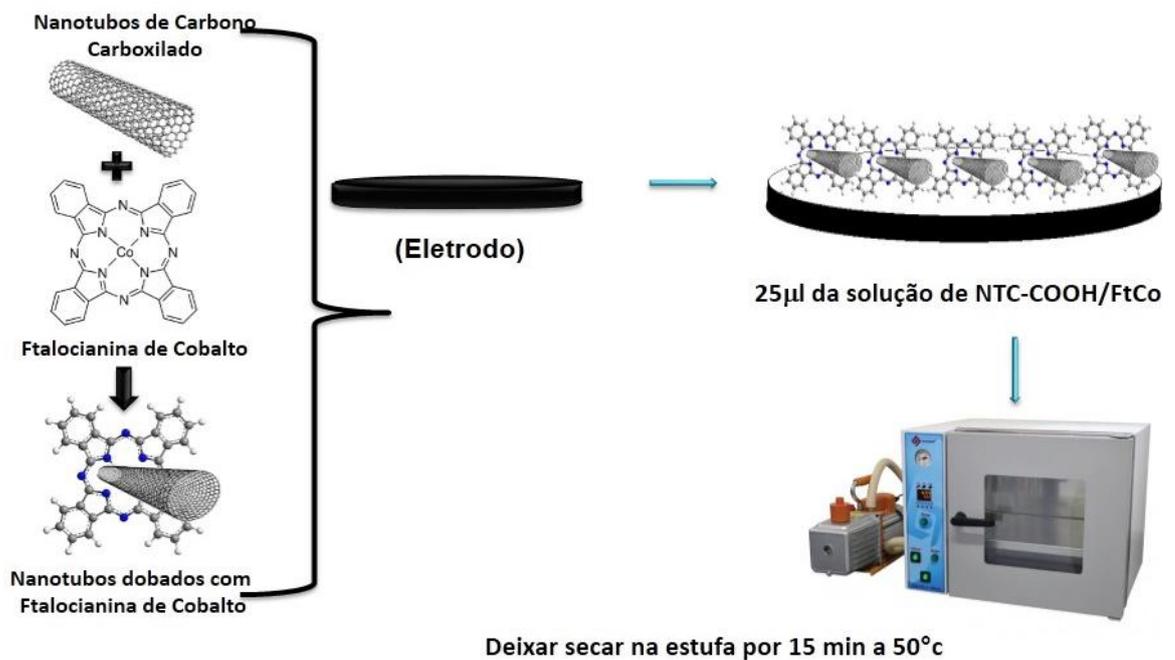
**FIGURAS****Figura 1.****Figura 2.**

Figura 3.

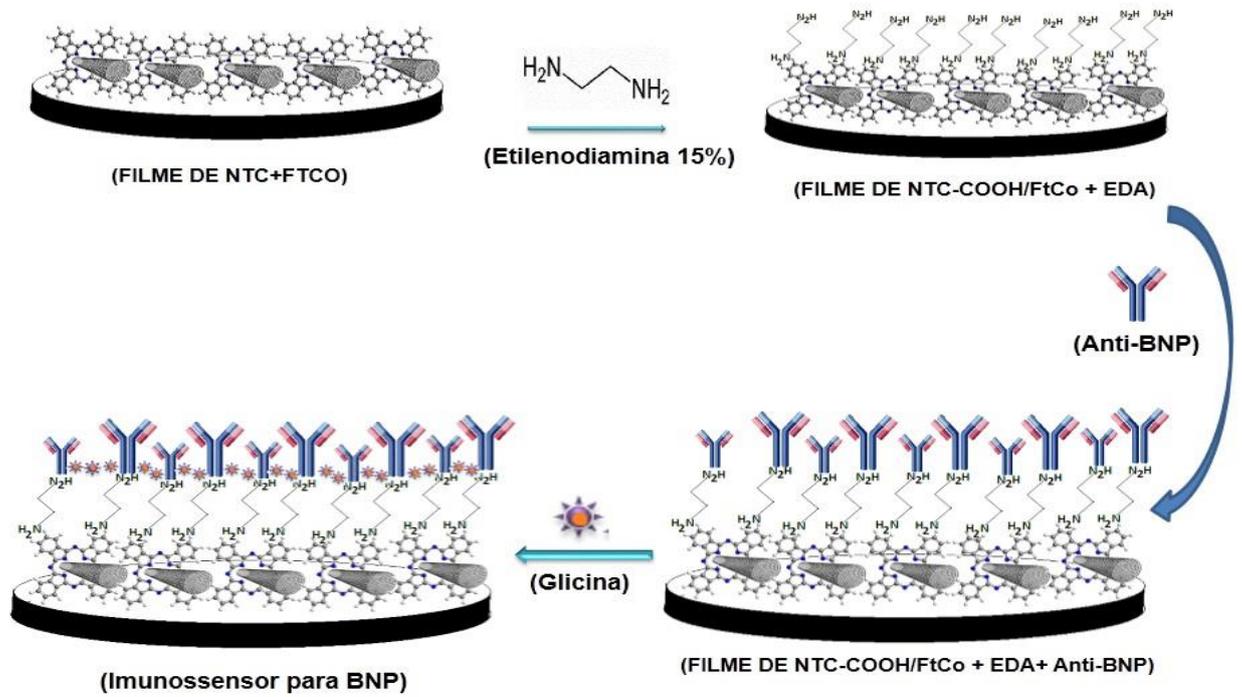


Figura 4.

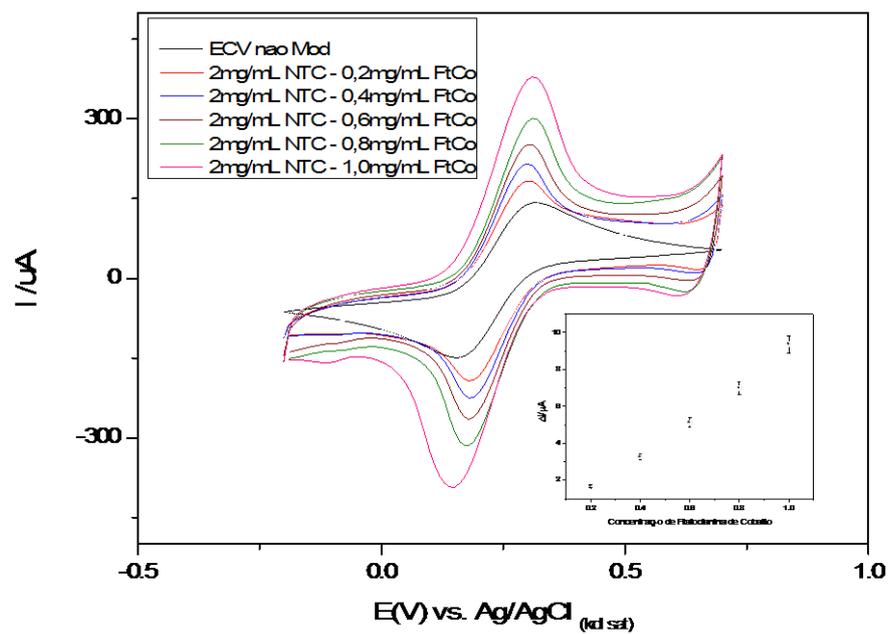


Figura 5.

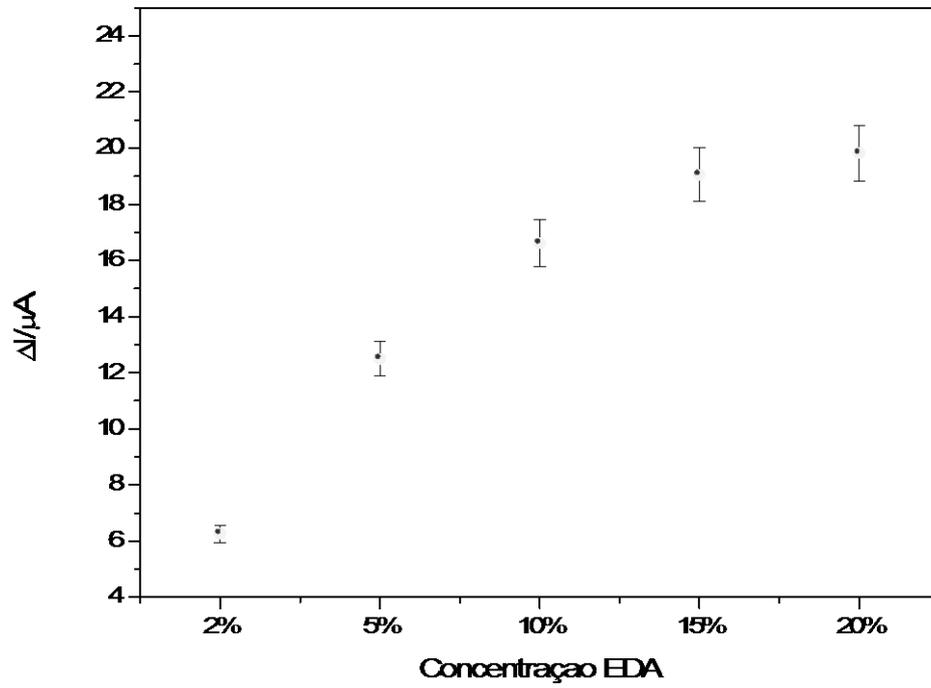
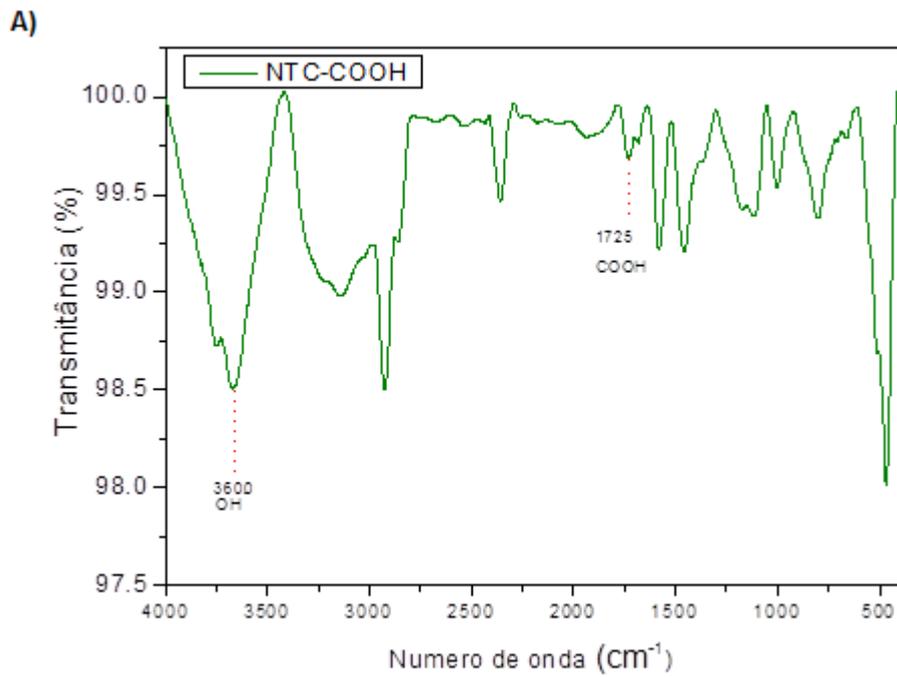
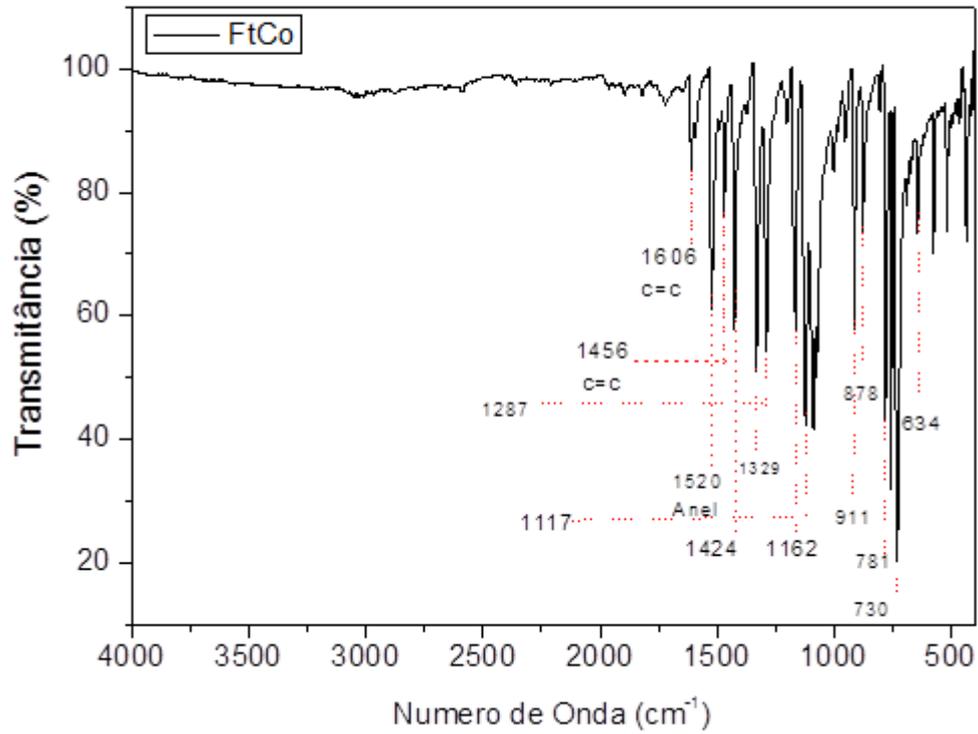


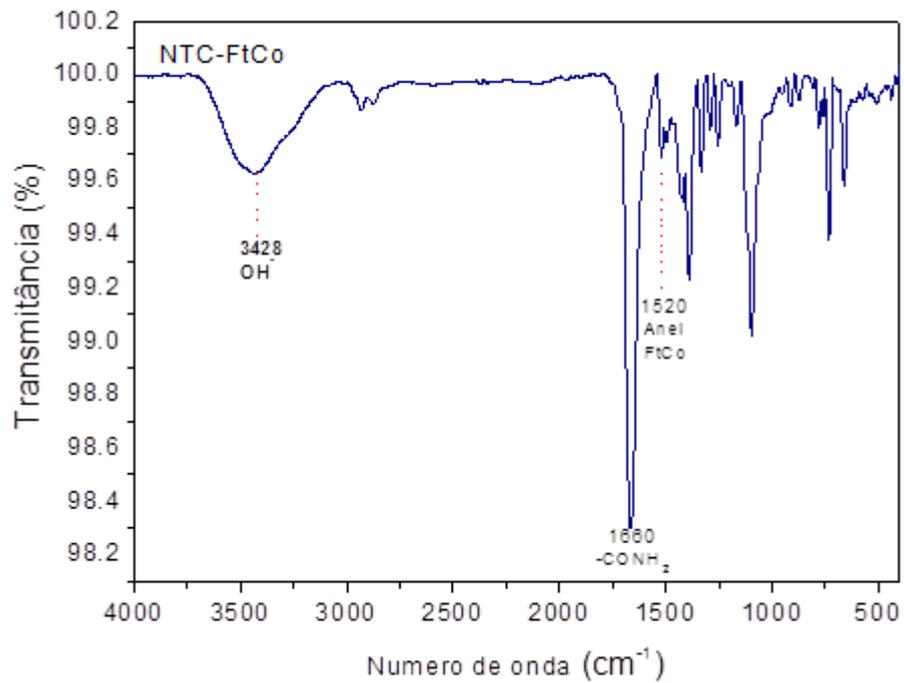
Figura 6



B)



C)



D)

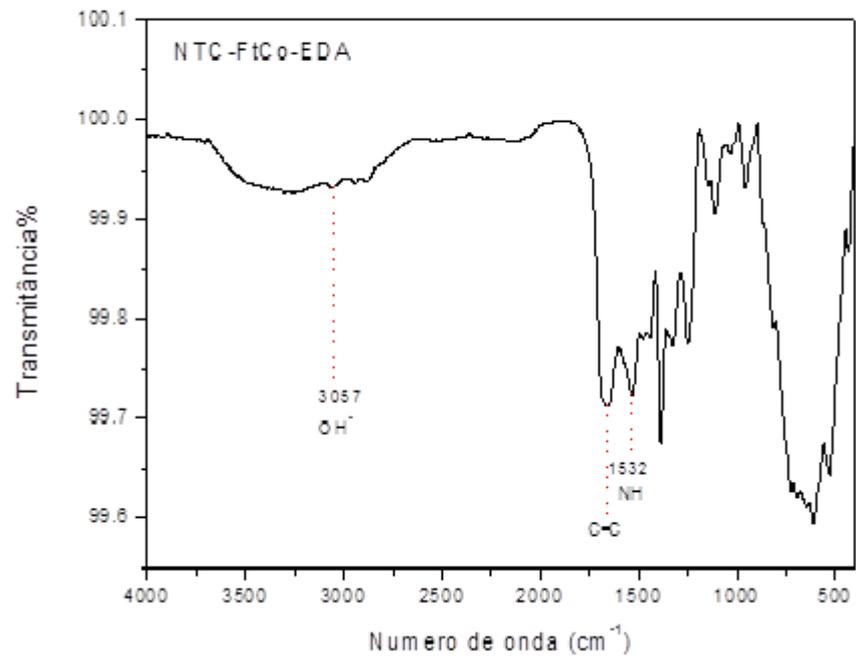


Figura 7.

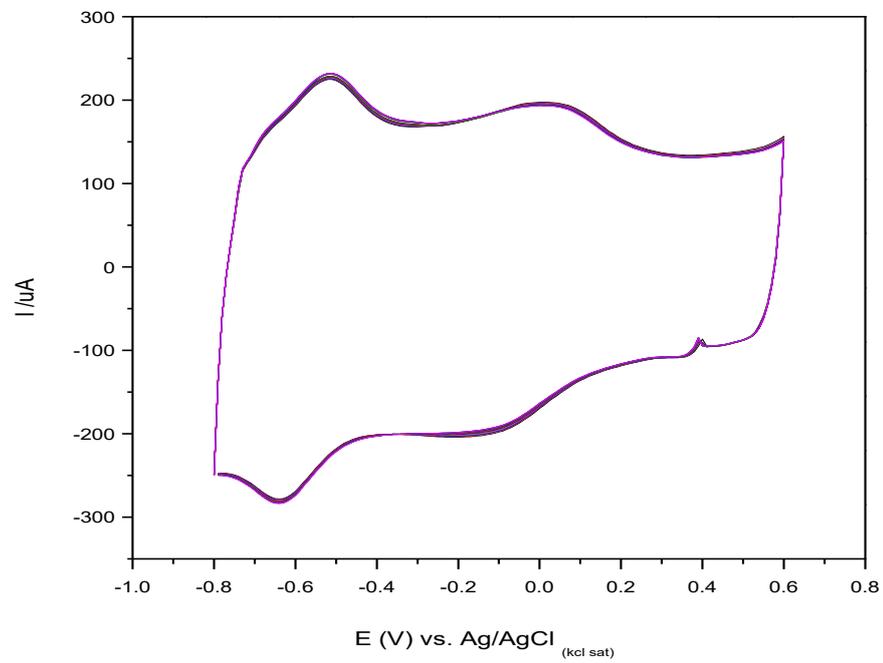


Figura 8.

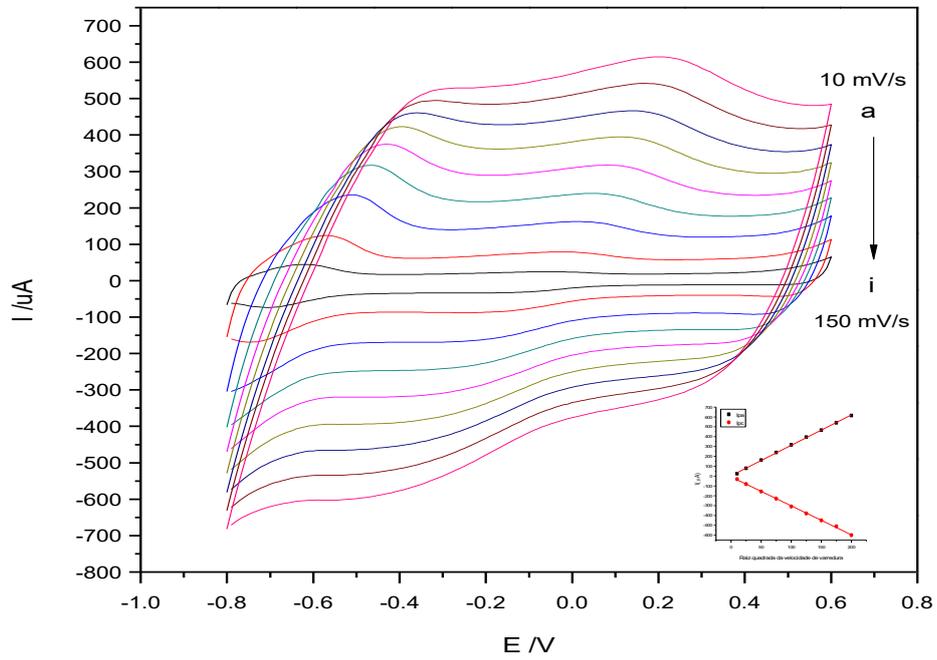


Figura 9.

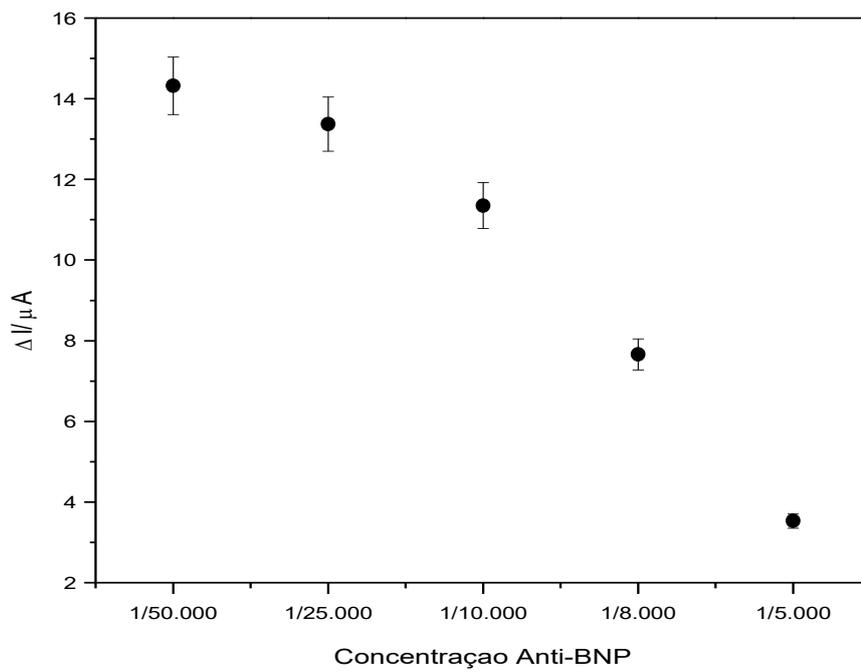


Figura 10.

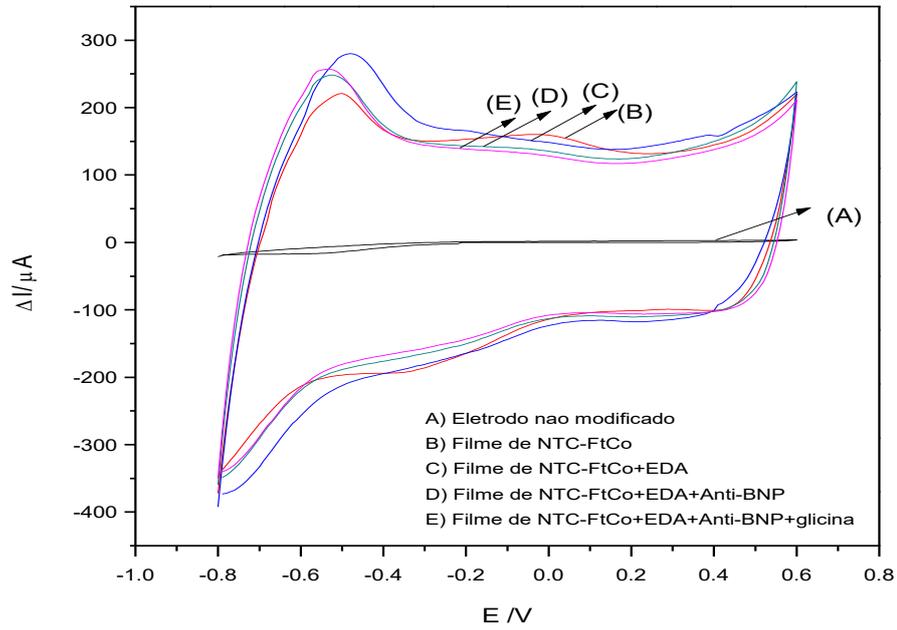


Figura 11.

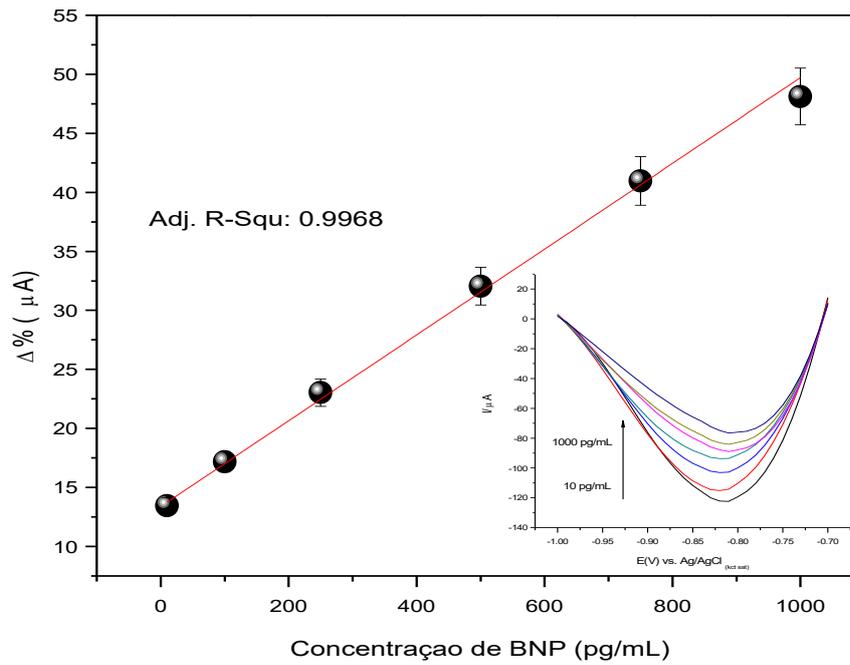
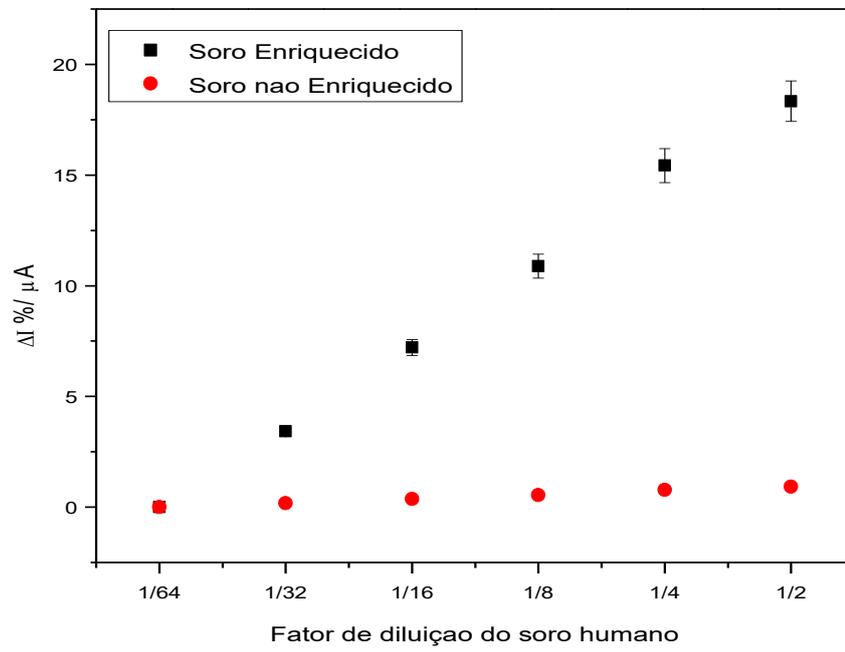


Figura 12.



## 4 CONCLUSÃO

O presente trabalho desenvolveu com sucesso um imunossensor para detecção sensível do BNP livre de marcação e sonda redox. Isso foi possível graças as propriedades redox e eletrocatalíticas do filme nanoestruturado de NTC-FtCo-EDA. No qual a ftalocianina de cobalto sofre processos redox, eliminando a necessidade de utilização de uma sonda redox para realização das leituras eletroquímicas. Além disso, a FtCo quando presente no filme, demonstrou diminuição na resistência a transferência de elétrons mesmo quando imobilizada no eletrodo de trabalho. Os nanotubos de carbono foram utilizados para ampliar a resposta do sensor, de modo a melhorar a sensibilidade do mesmo devido suas propriedades como baixa resistividade e alta condutividade elétrica.

A modificação do eletrodo impresso com proposta de desenvolvimento de testes rápidos utilizando o filme nanoestruturado de NTC-FtCo-EDA contribuiu para construção de um sensor estável e reproduzível eletroquimicamente. Os grupos livres reativos da EDA foram explorados para imobilização orientada do anticorpo anti-BNP.

A otimização das condições experimentais forneceu uma reta de calibração para as diferentes concentrações de BNP do imunossensor proposto, demonstrando que o sistema apresentou boa linearidade com  $r=0,996$ , apresentando um limite de detecção de 3,3 pg/mL em amostras em solução padrão e soro. Os estudos eletroquímicos desenvolvidos comprovaram a eficiência da FtCo em mediar a transferência de elétrons diretamente na interface sensora, dispensando o uso de um eletrólito com propriedades redox. O filme nanocompósito de NTC-FtCo-EDA demonstrou propriedades desejáveis, tais como estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade para a biomolécula testada.

Por fim, o imunossensor desenvolvido nesta tese, comparado aos métodos existentes na literatura, mostra-se eficaz em detectar o BNP em níveis clínicos e de importância para o diagnóstico da insuficiência cardíaca.

## REFERÊNCIAS

- ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A. Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini-Review. **Electromagnetics**, 28, 214-242, 2008.
- ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A.; MARKS, R. S.; LOWE, C. R.; CULLEN, D. C.; WEETALL, H. H.; KARUBE, Overview of optical biosensing techniques. I. **Handbook of Biosensors and Biochips**. Wiley, Weinheim, 2007.
- AHMED, N.H.; BROOR, S., **Journal of Vector Borne Diseases** 51, 194-199, 2014.
- AKCELRUD, L. “Fundamentos da ciência dos polímeros” Barueri-SP, Manole, 1-5, 2007.
- ALBANESI, F. M. **Insuficiência cardíaca no Brasil**. Arq Bras Cardiol. 71(4):561-2, 1998.
- ALBERT, S.; ALBERT, K. K.; QUACK, M. **High-resolution Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. Handbook of high-resolution spectroscopy. New York: John Wiley & Sons, 2011.
- APETREI, I. M. et al. Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt(II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 138–144, 2013.
- ARAB, S. et al., **Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications**. J Am Coll Cardiol, 48(9):1733-41, 2006.
- ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 23, 1083-1100, 2008.
- BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: Ed. Wiley India, 2ª edição. 827p, 2006.
- BARD, J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2ª ed. New York: Ed. Wiley,, 864, 2001.
- BAREK, J.; FOGG, A. G.; MUCK, A.; ZIMA, J. Crit. **Rev. Anal. Chem.** 2001, 31, 291.
- 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.
- BIEDERMAN, H. et al., “**Characterization of Glow-Discharge-Treated Cellulose Acetate Membrane Surfaces for Single-Layer Enzyme Electrode Studies**”, Journal of Applied Polymer Science, v. 81, pp. 1341 – 1352, 2001.
- BOCCHI, E. A. et al., **Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012**. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol, 98(1 supl. 1):1-33, 2012.

BOCCHI, E. A. et al., Interamerican Society of Cardiology. **The reality of heart failure in Latin America.** J Am Coll Cardiol. Review, 62, 11, 949-58, 2013.

BOCCHI, E. A. et al., **Sociedade Brasileira de Cardiologia.** III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure. Arq Bras Cardiol. 93, 3-70, 2009.

BONI, A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; LANZA, M.; TANAKA, S.M.C.N; TANAKA, A.. Application of a Biomimetic Sensor Based on Iron Phthalocyanine Chloride: 4-Methylbenzylidene-Camphor Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 21. 1377-1383, 2010.

BOROLE, D.D., et al., **Conducting polymers: an emerging field of biosensors.** Designed Monomers and Polymers, 9(1): p. 1-11, 2006.

BRAUNWALD, E. **Heart failure.** JACC Heart Fail. Review, 1(1):1-20 2013.

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

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

BRISTOW, M. R.; LOWES, B. D. **Management of Heart Failure In: Braunwald E.** Heart Disease. Textbook of Cardiovascular Medicine. WB Saunders. 7<sup>a</sup> ed. 2004

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

CHEN, H.; JIANG, C.; YU, C.; ZHANG, S.; LIU, B.; KONG, J. **Protein chips and nanomaterials for application in tumor marker immunoassays.** Biosensors and Bioelectronics, v. 24, p. 3399-33411, 2009

CHEN, X.; DONG, S. J. **Sol-gel-derived titanium oxide/copolymer composite based glucose biosensor.** Biosensors and Bioelectronics, v. 18, p. 999-1004, 2003

CHOUKOROV, A. et al., **“Properties of Amine-Containing Coatings Prepared by Plasma Polymerization”**, Journal of Applied Polymer Science, v. 92, pp. 979 – 990, 2004.

CLARK, A.L. Origin of symptoms in chronic heart failure. **Heart**, St. Louis, v.92, n. 1, p.12-16, 2005.

CLARK, L. C.; LYONS, C. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.** Annals of the New York Academy of Science, v. 102, p. 29-45, 1962.

CLERICO, A.; FONTANA, M.; ZYW, L.; PASSINO, C.; EMDIN, M. **Comparison of the diagnostic accuracy of brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP immunoassays in chronic and acute heart failure: a systematic review.** Clin Chem, 53(5):813-22, 2007.

CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P. O'KENNEDY, R. J. **Antibody production, design and use for biosensor-based applications.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 20, p. 10-26, 2009.

COSNIER, S. **Biosensors based on electropolymerized films: new trends.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3): p. 507-520, 2003.

COSTE, J.; JOURDAIN, P.; POUCHOT, J. **A gray zone assigned to inconclusive results of quantitative diagnostic tests: Application to the use of brain natriuretic peptide for diagnosis of heart failure in acute dyspneic patients.** *Clin Chem*; 52(12):2229-35, 2006.

CHOUDHARY, R.; IQBAL, N.; KHUSRO, F.; HIGGINBOTHAM, E.; GREEN, E. et al. Heart failure biomarkers. **J Cardiovasc Transl Res** 6(4): 471-484, 2013.

DEEPSHIKHA, T. B. A. **Review on Synthesis and Characterization of Nanostructured Conducting Polymers (NSCP) and Application in Biosensors.** *Analytical Letters*, 44(6): p. 1126-1171, 2011.

DEVASENATHIPATHY, R. et al. Determination of L-cysteine at Iron Tetrasulfonated Phthalocyanine Decorated Multiwalled Carbon Nanotubes Film Modified Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 682–690, 2015.

DOUST, J. A.; GLASZIOU, P. P.; PIETRZAK, E.; DOBSON, A. J. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. **Arch Intern Med** v.164, n.18, p.1978-84, 2004.

Dutra, O. P. **II Diretriz Brasileira de Cardiopatia Grave.** Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 87(2):1-75, 2006

FEOLA, M. et al. Role of galectin-3 and plasma B type-natriuretic peptide in predicting prognosis in discharged chronic heart failure patients. **Medicine**, v. 95, n. 26, p. 4014, 2016.

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.

FOSCHINI, M. Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009

FOWLER, J. M.; WONG, D. K. Y.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R.. **Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors.** *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, p. 115-143, 2008.

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

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

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.

GERALDO, D. A.; CHAMUNORWA, A. T.; LIMSON, J.; NYOKONG, T.; *Electrochim. Acta*, 53, 8051, 2008.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. **Application of conducting polymers to biosensors**. *Biosensors & Bioelectronics*, 17: 345-359, 2002.

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

GRIESHABER D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; **REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures**. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

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 ed. New York: John Wiley & Sons, 560, 2007.

HAIDER, S.; PARK, S.; SAEED, K.; FARMER, B.L. Swelling and electroresponsive characteristics of gelatin immobilized onto multi-walled carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B*, v. 124, p. 517-528, 2007.

HASAN, A.; NURUNNABI, M.; MORSHED, M.; PAUL, A.; POLINI, A.; KUILA, T.; AL HARIRI, M.; LEE, Y., JAFFA, A. A. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. *BioMed Research International*, 307519, 2014.

HEIDENREICH, P. A.; ALBERT, N. M.; ALLEN, L. A.; BLUEMKE, D. A.; BUTLER, J.; FONAROW, G. C.; IKONOMIDIS, J. S.; KHAVJOU, O.; KONSTAM, M. A.; MADDOX, T. M.; NICHOL, G.; PHAM, M.; PIÑA, I. L.; TROGDON, J. G. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail*, 6:606-619, 2013.

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

Hunt, S. A. et al., **focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation**. *J Am Coll Cardiol*. 15, 53, 1-90, 2009.

JANG, H. R.; A. W. WARK; S. H. BAEK; B. H. CHUNG; H. J. LEE, "Ultrasensitive and ultrawide range detection of a cardiac biomarker on a surface plasmon resonance platform," *Analytical Chemistry*, vol. 86, no. 1, pp. 814-819, 2014.

JANUZZI, J. L. Et al., **The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study**. *Am J Cardiol*, 95(8):948-54, 2005.

JIN, Y.; YAO X.; LIU Q.; LI, J. **Haipirm DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator**. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1126-1130, 2006.

JORGE, A. J. L. et al . Avaliação de Estratégias para Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Normal no Ambulatório. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 103, n. 3, p. 231-237, Sept. 2014 .

KAWAKOSHI, A.; HYODO, S.; INOUE, K.; KOBAYASHI, Y.; TAKEI, Y. Four natriuretic peptides (ANP, BNP, VNP and CNP) coexist in the sturgeon: identification of BNP in fish lineage. **J Mol Endocrinol**. v.32, n.2, p.547-55, 2004.

KELDER, J. C. et al., **Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis**. *Heart*. 97(12):959-63, 2011.

KELDER, J. C.; COWIE, M. R.; MCDONAGH, T. A.; HARDMAN, S. M.; GROBBEE, D. E.; COST, B. et al. Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. **Heart**. v.97, p.959-63, 2011

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.

LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P., Phthalocyanines: Properties and Applications, VCH-Publishers, Vol 1-4, 1989.

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 screenprinted electrodes in environmental assays - A review. **Analytical Chimica Acta**, 734, 31-44, 2012.

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.

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.

MACHADO, I. R. L.; MENDES, H. M. F.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R. Revisão: Nanotubos de carbono: potencial de uso em medicina veterinária *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.10, p.1823-1829, 2014.

MAISEL, A. et al., **State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice**. *Eur J Heart Fail*, 10(9):824-39, 2008.

MAISEL, A. S. et al., **Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure**. *N Engl J Med*.;347(3):161-7, 2002.

MANT, J.; AL-MOHAMMAD, A.; SWAIN, S.; LARAMÉE, P. Management of chronic heart failure in adults: synopsis of the National Institute for Health and clinical excellence guideline. **Ann Intern Med.** v.155, n.4, p.252-9, 2011.

MARINHO, F. C.; VARGAS, F. S.; FABRI, J. JR.; ACENCIO, M. M.; GENOFRE, E. H.; ANTONANGELO, L. et al. Clinical usefulness of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of pleural effusions due to heart failure. **Respirology.** v.16, n.3, p. 495-9, 2011.

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: 12 de dezembro de 2017.

MCKEE, P. A.; CASTELLI, W. P.; MCNAMARA, P. M.; KANNEL, W. B. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. **N Engl J Med.** 285, (26), 1441-6, 1971.

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

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

MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A.; **Talanta,** 79, 1406, 2009.

MORROW, D. A.; LEMOS, J. A. **Benchmarks of the assessment of novel cardiovascular biomarkers.** Circulation, 115:949-952, 2007.

NAKANISH, K., MUGURUMA, H., KARUBE, I. “**A Novel Method of Immobilizing Antibodies on a Quartz Cristal Microbalance Using Plasma-Polymerized Films for Immunosensors**”, Analytical Chemistry v. 68, n. 10, pp. 1695-1700, 1996.

NASCIMENTO, R. F., SELVA, T. M. G., RIBEIRO, W. F., BELIAN, M. F., ANGNES, L., NASCIMENTO V. B. **Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt(II)-phthalocyanine modified carbon paste electrode.** Talanta, vol. 105, pag. 354–359. 2013.

NOGUEIRA, I. D. B.; SERVANTES, D. M, NOGUEIRA, P. A. M. S.; PELCERMAN, A.; SALVETTI, X. M.; SALLES, F. et al. Correlação entre Qualidade de Vida e Capacidade Funcional na Insuficiência Cardíaca. **Arq Bras Cardiol.** 2010.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Química Nova,** v. 38, p. 924–931, 2015.

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos,** v.8.1, p.1 –11, 2013.

- OMLAND, T.; HAGVE, T. A. Natriuretic peptides: physiologic and analytical considerations. **Heart Fail Clin**; v.5, n.4, p.471-87, 2009.
- OSMA, J. F.; STOYTICHEVA, M. Biosensors: recent advances and mathematical challenges. 1 ed. **Omnia Science**, 2014.
- 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.
- PAROLO, C.; MERKOCI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chemical Society Reviews**, 42(2): p. 450-457, 2013.
- PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 25:1012-1021, 2002.
- PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, 12, 1-15, 2014.
- PRONTERA, C., et al. Comparison of a fully automated immunoassay with a point-of-care testing method for B-type natriuretic peptide. **Clin Chem** 51(7):1274-6, 2005.
- RAMASAMY, I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1279-1296, 2011.
- 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.
- 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.
- RAWAL, R.; CHAWLA, S.; DAHIYA, T.; PUNDIR, C.; **Anal. Bioanal. Chem.**, 401, 2599, 2011.
- 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.
- REDFIELD, M. M. Plasma brain natriuretic peptide to detect preclinical ventricular systolic or diastolic dysfunction: a community-based study. **Circulation**, 109(25):3176-81, 2004.
- RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 21(3), p. 389-407, 2005.
- ROBERTS, E. et al. The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. **BMJ**, v. 350, n. 910, p. 1-16, 2015.
- SADIK, O.A. et al. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques **Biosen. Bioelectron.**, v. 24, p. 2749-2765, 2009.

SANTALO, B. M.; GUINDO, S. J.; ORDONEZ, L. J. Biological Markers of Myocardial Necrosis. **Revista Española de Cardiología**, v. 56, p. 703-720, 2003.

SCHOBER, K.; ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. Biochemical markers of cardiovascular disease. Textbook of veterinary internal medicine volume 2. 6. ed. St. Louis, Missouri: **Elsevier Saunders**, p. 940-947, 2010.

SCRUTINIO, D.; LAGIOIA, R.; RICCI, A. et al. Prediction of mortality in mild to moderately symptomatic patients with left ventricular dysfunction. The role of the New York Heart Association classification, cardiopulmonary exercise testing, two-dimensional echocardiography and Holter monitoring. **Eur Heart J**. 15:1089-95. 1994.

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.

SILVA, R. M. F. L. Biomarcadores BNP e NT-pro-BNP na insuficiência cardíaca: revisão de literatura. **Materials and Methods**, v. 4, p. 604-608, 2014.

STORTI, S. et al., Analytical performance and clinical results of a fully automated MEIA system for brain natriuretic peptide assay: comparison with a point of care testing method. **Clin Chem Lab Med**; 42(10):1178-85, 2004.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

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

TANG, J. L.; CHENG, S. F.; HSU, W. T.; CHIANG, T. Y.; CHAU, L. K. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 119: 105-109, 2006

The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. **Lancet**. 342(8875):821-8, 1993.

TICIANELLI, E. A., GONZALEZ, E. R. Eletroquímica: Princípios e Aplicações. São Paulo, **Edusp**, 2013.

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.

VENDRAME, Z. B. Eletrodos modificados e não modificados na determinação de compostos sulfurados – um estudo comparativo. Universidade Federal de Santa Maria, p.183, 2004.

VIDAL, J. C.; GARCIA-RUIZ, E.; CASTILLO, J. R. Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. **Microchimica Acta**, 143(2-3): p. 93-111, 2003.

VILLACORTA, H.; MASETTO, A. C.; MESQUITA, E. T.; C-reactive protein: an inflammatory marker with prognostic value in patients with decompensated heart failure. **Arq Bras Cardiol**, 88(5):585-9, 2007.

WU, L.; YAN, F.; JU, H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. **Journal of Immunological Methods**, 322: 12-19, 2007.

YAHIA, I.S. et al., *Optics Communications*, v. 285, p. 3122-3127, 2012

YANCI, C.W. et al. ACCF/AHA Guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, v. 128, n. 16, p. 240-327, 2013.

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

YIN, H.; ZHOU, Y.; XU, J.; AI, S.; CUI, L.; ZHU, L. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 144-150, 2010.

ZAGAL, J. H. et al., *Porphyrins Phthalocyanines*, 16, 713, 2012.

ZANFOLIM, A. A. et al., Fabricação e caracterização estrutural de filmes evaporados de ftalocianinas. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 114, p. 12290- 12299, 2010.

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