



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

CECÍLIA MACIEL PRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP**

Recife
2019

CECÍLIA MACIEL PRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra.

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

P896d	Prado, Cecília Maciel. Desenvolvimento de um imunossensor nanoestruturado para detecção do H-FABP / Cecília Maciel Prado. – 2018. 77 folhas, il., gráfs., tabs. Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2019. Inclui Referências. 1. Engenharia Biomédica. 2. Imunossensor. 3. Nanotubos de carbono. 4. Azul de metileno. 5. H-FABP. 6. Infarto agudo do miocárdio. I. Dutra, Rosa Amália Fireman. (Orientadora). II. Título. UFPE 610.28 CDD (22. ed.) BCTG/2020-27
-------	---

CECÍLIA MACIEL PRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovada em: 14 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Rosa Amália Fireman Dutra (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Ataíde de Lima (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Aos meus pais Jaime e Rosália e irmão Mito por todo amor, carinho e dedicação. Ao meu amor Rafa por todo companheirismo, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

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

À Prof^a. Rosa Fireman Dutra, pela oportunidade concedida, confiança, orientação e dedicação dispensada desde o início.

À minha família por sempre acreditarem em mim e me apoiar em cada desafio. Sempre estando ao meu lado em tudo que idealizo e me comprometo a fazer, apoiando meus sonhos e fazendo com que cada pequena conquista seja comemorada.

À Rafaela, por me proporcionar um amor verdadeiro, estando ao meu lado nos momentos em que mais precisei, sendo meu porto seguro. Obrigada por cuidar de mim e encher meus dias de amor e carinho.

À Renatinha, que me acompanha e me guia desde o início da minha vida acadêmica. Obrigada por não desistir de mim.

Aos meus amigos Langueros pelos longos anos de amizade, companheirismo, aventuras, alegrias e tristezas compartilhadas. Por sempre torcerem pela minha felicidade e vibrar minhas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico (LAPED) com os quais foram divididos momentos de descontração e apoio.

À Paula e Thiago pelas experiências científicas, religiosas e pessoais divididas ao longo dessa caminhada. Amizade que estará para sempre marcada em meu coração.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por milhões de óbitos por ano. O desenvolvimento de testes rápidos e quantitativos que auxiliem no diagnóstico precoce do IAM apresenta-se como imperativo. Recentemente, o H-FABP vem sendo apontado como um eficiente marcador precoce de isquemia miocárdica, o que o torna importante no diagnóstico precoce do IAM. Nos últimos anos, os biossensores têm se revelado como um dos melhores sistemas de diagnóstico rápido devido sua alta sensibilidade, praticidade e possibilidade de análise em tempo real. O uso de nanomateriais, aliados à polímeros condutores e corantes com propriedades catalíticas, aprimoram a superfície eletroativa do biossensor, gerando um maior desempenho de sensibilidade para detecção do H-FABP. Nesta tese um imunossensor eletroquímico baseado em filme de politionina (PTh) e nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados com azul de metileno (MB) foi desenvolvido para detecção do H-FABP, um importante marcador precoce do infarto agudo do miocárdio. O uso combinado destes nanomateriais possibilitou um melhor desempenho de sensibilidade para detecção do H-FABP. Para construção da plataforma sensora, eletrodos de ouro foram modificados através da eletropolimerização da PTh. Posteriormente, um filme nanoestruturado foi montado através da técnica de *dropcasting*, com uma solução de NTCs carboxilados funcionalizados com o MB (NTC@MB). Os grupos carboxilas dos nanotubos expostos na plataforma sensora foram explorados para imobilização orientada dos anticorpos anti-H-FABP. Após imobilização dos anticorpos, os sítios ativos não-reativos do filme foram bloqueados com uma solução de glicina (100mM) pH.7,4. A caracterização do sensor foi realizada utilizando a técnicas de voltametria cíclica. O filme de PTh-NTC@MB apresentou boa estabilidade quando submetido a sucessivas leituras voltamétricas, não existindo deslocamento significativo dos picos (CV% para I_{pa} e I_{pc} de 3% respectivamente). A resposta amperométrica foi obtida por voltametria cíclica, mostrando respostas lineares e limites de detecção para o H-FABP, respectivamente, entre 2,5 a 25,0 ng/mL e 3,1 ng/mL em amostras tamponadas; e entre 5,0 a 25,0 ng/mL e 4,5 ng/mL em soro humano. A boa reprodutibilidade e a faixa clínica obtida com esse imunossensor suportam sua

utilidade como uma ferramenta potencial para testes de diagnóstico precoce do IAM, com a vantagem de ser um método passível de portabilidade como os testes de tira lateral.

Palavras-chave: Imunossensor. Nanotubos de carbono. Azul de metileno. H-FABP. Infarto agudo do miocárdio.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the leading causes of death in world, being responsible for millions of deaths per year. The development of rapid and quantitative tests that help in the early diagnosis of AMI is imperative. Recently, H-FABP has been identified as an efficient early marker of myocardial ischemia, which makes it important in the early diagnosis of AMI. Biosensors have proved to be one of the best rapid diagnostic systems due to their high sensitivity, practicality and the possibility of real-time analysis. The use of nanomaterials, allied to conductors polymers and dyes with catalytic properties, enhances the biosensors electroactive surface, generating a higher sensitivity performance for the detection of H-FABP. In this thesis, an electrochemical immunoassay based on Politionine (PTh) film and carbon nanotubes (NTC) functionalized with methylene blue (MB) was developed for the detection of H-FABP, an important early marker of acute myocardial infarction. The combined use of these nanomaterials enabled a higher sensitivity performance for H-FABP detection. For the construction of the sensor platform, gold electrodes were modified by PTh electropolymerization. Subsequently, a nanostructured film was assembled by the dropcasting technique with a solution of carboxylated NTCs functionalized with MB (NTC@MB). The carboxyl groups of the nanotubes exposed on the sensing platform were exploited for targeted immobilization of the anti-H-FABP antibodies. After immobilization of the antibodies, the non-reactive active sites of the film were blocked with a glycine solution (100 mM) pH.7.4. The characterization of the sensor was performed using cyclic voltammetry technique. The PTh-NTC@MB film presented good stability when subjected to successive voltametric readings, with no significant displacement of the peaks (CV% for I_{pa} and I_{pc} of 3% respectively). The amperometric response was obtained by cyclic voltammetry, showing linear responses and detection limits for H-FABP, respectively, between 2.5 to 25.0 ng / mL and 3.1 ng / mL in buffered samples; and between 5.0 to 25.0 ng / ml and 4.5 ng / ml in human serum. The good reproducibility and the clinical range obtained with this immunosensor support its usefulness as a potential tool for early diagnosis tests of AMI, with the advantage of being a portability method such as lateral strip tests.

Keywords: Immunosensor. Carbon nanotubes. Methylene blue. H-FABP. Acute myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais causas de morte no Brasil	18
Figura 2 –	Gráfico de cinética de liberação dos marcadores cardíacos.....	22
Figura 3 –	Esquema básico de um biossensor.....	24
Figura 4 –	Esquema demonstrativo de um imunossensor marcado.....	27
Figura 5 –	Esquema demonstrativo de um imunossensor não marcado.....	28
Figura 6 –	Representação gráfica da técnica de VC	31
Figura 7 –	Estrutura química do monômero de Tionina	33
Figura 8 –	Estrutura química do Azul de Metileno	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μA	Microampère
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BNP	Peptídeo Natriurético do tipo B
CK-Mb	Creatinoquinase Fração MB
COOH	Grupo funcional carboxila
DCV	Doenças Cardiovasculares
E	Potencial
ECG	Eletrocardiograma
EDA	Etilenodiamina
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
H-FABP	Proteína de Ligação de Ácidos Graxos do Coração
I	Corrente
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
kDa	Kilo Dalton
MB	Azul de Metileno, do inglês, <i>Methylene Blue</i>
MWCNTs	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes, do inglês, <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>
Myo	Mioglobina, do inglês, <i>Myoglobin</i> .
Ng/ml	Nanograma por mililitro
NH ₂	Grupo funcional amina
NTC	Nanotubo de Carbono
NTCs	Nanotubos de Carbono
PANI	Polianilina
PCs	Polímeros condutores
POCT	Teste a beira leito, do inglês, <i>Point-of-care testing</i>

Ppy	Polipirrol
Pth	Politionina, do inglês, <i>Polithionine</i> .
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples, do inglês, <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada, do inglês, <i>Square Wave Voltammetry</i> .
TN	Tionina
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
WHO	Organização mundial de saúde, do inglês, <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Infarto Agudo do Miocárdio.....	18
2.1.1	Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio.....	19
2.1.2	H-FABP.....	20
2.1.2.1	Métodos diagnósticos do H-FABP	23
2.2	Biossensores	24
2.2.1	Métodos de transdução	25
2.2.2	Imunossensores.....	26
2.2.3	Tipos de detecção em imunoensaios.....	26
2.2.3.1	Imunossensores não marcados	27
2.2.4	Técnicas eletroquímicas.....	29
2.2.4.1	Voltametria Cíclica	30
2.2.5	Materiais empregados na superfície sensora.....	31
3	OBJETIVO	35
3.1	Específicos	35
4	RESULTADO	36
4.1	IMUNOSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO DO H-FABP: UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	36
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), destacando-se o infarto agudo do miocárdio (IAM), representam um relevante problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte em todo o mundo (BAENA et al., 2012; WHO, 2017). Diferenciar com segurança pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) de pacientes com dor torácica não isquêmica, ainda continua sendo um grande desafio, especialmente quando o diagnóstico precisa ser realizado em pacientes que não apresentam sintomas claros ou alterações características de lesão miocárdica aguda no eletrocardiograma (ECG). Por mais que o ECG seja a primeira ferramenta diagnóstica para a detecção do IAM, este não possui uma boa sensibilidade diagnóstica (~50%) e, portanto, não pode ser exclusivo no seu diagnóstico (RITA et al., 2016). Vários marcadores bioquímicos são utilizados para auxiliar no diagnóstico do IAM, afim de estratificar seu risco e auxiliar na escolha do tratamento adequado.

Os biomarcadores cardíacos são componentes das estruturas celulares liberadas na circulação quando ocorre lesão no miocárdio, demonstrando a expressão bioquímica da lesão das fibras cardíacas (BRIEGER et al., 2004). Os testes para quantificação dessas macromoléculas no soro sanguíneo são de suma importância devido à obtenção de informações associadas à severidade e o estágio da lesão ao músculo cardíaco (RESENDE et al., 2015). A quantificação dos marcadores bioquímicos podem estar relacionados diretamente com a lesão ao tecido do miocárdio, como as troponinas cardíacas, creatinoquinase fração Mb (CK-Mb), mioglobina e a proteína de ligação de ácidos graxos do coração (H-FABP); ou podem estar relacionadas ao estresse biomecânico, através da detecção do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) (MIRANDA; LIMA, 2014).

Recentemente, o H-FABP vem sendo apontado como um eficiente marcador precoce de isquemia miocárdica, podendo ser associado com as troponinas cardíacas (cTnI e cTnT) para um melhor diagnóstico e desfecho do IAM (GURURAJAN et al., 2010). O H-FABP é liberado rapidamente após a lesão do miocárdio para a corrente sanguínea, anteriormente à troponina cardíaca, e pode ser útil tanto no diagnóstico precoce quanto para exclusão do IAM (HOFFMANN et al., 2015a). Dado que o uso do H-FABP como ferramenta diagnóstica no IAM é um teste

recente, atualmente os ensaios comerciais existentes no mercado se baseiam em métodos clássicos, com baixa sensibilidade no geral, tendo assim seu uso limitado. Neste sentido, o desenvolvimento de testes rápidos e quantitativos que auxiliem num diagnóstico precoce para uma rápida intervenção apresenta-se como imperativo.

Nos últimos anos, os biossensores têm se revelado como um dos melhores sistemas de diagnóstico rápido devido sua alta sensibilidade, praticidade e possibilidade de análise em tempo real. Os biossensores são dispositivos analíticos compostos por um componente biológico ligado a um transdutor capaz de converter o sinal gerado pela interação biológica em um sinal mensurável. As biomoléculas podem ser proteínas, muitas vezes enzimas, ou outras macromoléculas, oligo ou polinucleotídeos, microrganismos, ou mesmo tecidos biológicos que exibem interações específicas com uma outra espécie analítica (GUPTA; MURTHY & PRABHA, 2018). Quando nestes dispositivos são utilizados antígenos ou anticorpos como biorreceptores, são classificados como imunossensores.

Atualmente, a tecnologia oferecida pelos biossensores vem possibilitando o desenvolvimento de dispositivos do tipo testes de pronto atendimento, do inglês “*point-of-care testing*” (POCT), um método analítico que possibilita acelerar o tempo de resposta do diagnóstico, sendo uma alternativa atrativa para uma tecnologia de uso à beira do leito (SYEDMORADI et al., 2017). Estes podem realizar a quantificação de moléculas biológicas, através de elementos de reconhecimento como enzimas, anticorpos ou antígenos em faixas de concentrações muito baixas, denominados nanobiossensores (FARRÉ; KANTIANI; BARCELÓ, 2007). Os imuno-POCT's são assim denominados porque se baseiam na reação de interação antígeno-anticorpo como elemento de reconhecimento. Um dos grandes desafios no desenvolvimento de imuno-POCT's práticos, rápidos e efetivamente competitivos a uma tecnologia “à beira do leito” ou *bedside* consiste em concomitantemente: a) alcançar baixos limites de detecção, sobretudo quando se pretende detectar em ordem de nanogramas; b) promover uma rápida resposta, ou seja, gerar um sinal elétrico imediato à interação antígeno-anticorpo, dispensando o uso de anticorpos ou antígenos conjugados à marcadores que se rendem a oxidar ou reduzir espécies eletroativas para geração do sinal elétrico; c) alcançar boa especificidade diagnóstica no acoplamento antígeno-anticorpo; d) fazer uso de tecnologias

transdutoras facilmente portabilizadas, e e) alcançar boa reprodutibilidade aliada a um baixo custo (KOKKINOS; ECONOMOU; PRODROMIDIS, 2016; WAN et al., 2013).

Um aspecto importante na construção de imuno-POCT relaciona-se à sensibilidade da resposta sensora, que se deve principalmente à quantidade de material imobilizado e o modo como os anticorpos são expostos para o reconhecimento dos epítomos dos antígenos. A introdução de nanomateriais, tais como os nanotubos de carbono (NTCs) conferem aos imuno-POCT um significativo aumento de sensibilidade, devido a maior quantidade de biomoléculas imobilizadas e a facilidade com que estas moléculas podem estar ligadas de modo não aleatório, além do aumento de condutividade por área (alta razão de aspecto)(SILVA et al., 2014). A conjugação de nanotubos de carbono à polímeros condutores (PCs) como a polianilina (KUMAR; KUMAR; AWASTHI, 2018), o polipirrol (AFZAL et al., 2017) e a politionina (XU et al., 2010),) tem sido bastante utilizada devido propriedades específicas, como estabilidade, processabilidade e fácil preparação. Os eletrodos modificados com PCs são bastante atrativos no desenvolvimento de biossensores, pois permitem controlar as propriedades das superfícies eletródicas e funcionalizá-las. Entre estes, a politionina apresenta grupos funcionais amino reativos, possibilitando ser utilizada para imobilização covalente de biomoléculas (GHICA; FERREIRA; BRETT, 2015).

Recentemente, o domínio das técnicas de modificações químicas de NTCs por introdução de diferentes grupos químicos tem sido exigido pela crescente demanda dos biossensores. O azul de metileno, no inglês *Methylene Blue* (MB), é um corante fenotiazínico que pode atuar como mediador redox, e que quando ligado aos NTCs, proporciona ao biossensor uma melhoria na transferência de elétrons (CHAGOVETS et al., 2012). Complementarmente, grupos funcionais proteína-reativos (NH₂, COOH e outros) presentes no MB, permitem uma imobilização de biomoléculas de modo mais estável, obtendo-se sensores mais reprodutivos e confiáveis (OLIVEIRA et al., 2011).

Diante do exposto, este trabalho descreve uma plataforma na qual foi formada por um filme polimérico condutor de politionina associado à NTCs conjugado ao MB com características eletrocatalíticas. O emprego de nanoestruturas aliada a técnicas

de imobilização, favoreceram a seletividade das reações entre o anticorpo e o antígeno, resultando em um imunossensor sensível e estável. Por fim, um imunossensor eletroquímico baseado em NTCs funcionalizados com MB foi desenvolvido para detecção do H-FABP, sendo um projeto inovador uma vez que nenhum imunossensor eletroquímico para o H-FABP está atualmente disponível comercialmente, podendo assim ser útil como uma ferramenta potencial para testes de diagnóstico precoce do IAM em unidades de saúde.

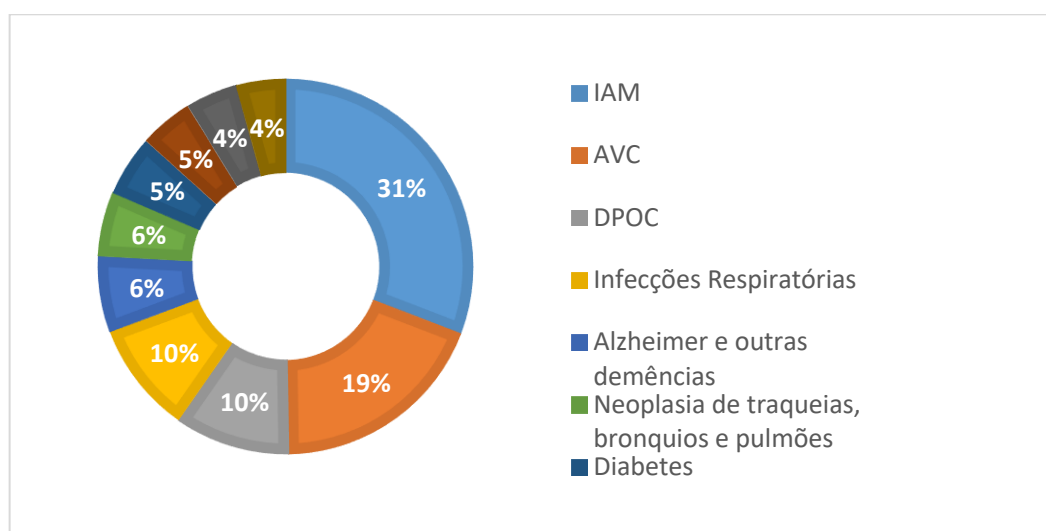
2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção encontra-se o referencial teórico da pesquisa.

2.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

A doença isquêmica do coração é a principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 8,7 milhões de óbitos anuais (SANTOS et al., 2018; WHO, 2017). No Brasil, esta doença também é a principal causa de óbito e representa uma taxa de 31% das mortes de origem cardiovasculares, ultrapassando a taxa de morte por acidente vascular cerebral, estimada em 19% (Figura 01) (RIBEIRO et al., 2016). Nos Estados Unidos e Europa, a cada ano aproximadamente 15 milhões de pacientes chegam à emergência com dor torácica aguda ou outros sintomas sugestivos de IAM, porém apenas uma pequena proporção desses pacientes apresenta-o de fato (LEVINE et al., 2016; ROFFI et al., 2016). A alta incidência pode ser justificada pela incapacidade de um controle eficaz dos fatores de risco clássicos, como tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia e obesidade (FORD, 2007; RUFF&BRAUNWALD, 2011).

Figura 1 - Principais causas de morte no Brasil.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2017).

O IAM caracteriza-se como a morte celular miocárdica e/ou necrose do músculo cardíaco, representando a evolução de uma isquemia miocárdica aguda (PESARO;

SERRANO JR.; NICOLAU, 2004; THYGESEN et al., 2012). Em resultado à isquemia, a musculatura cardíaca sofre diversas remodelações, tais como alteração na conformação, no tamanho e na espessura, além do acúmulo de tecido fibroso. Essas alterações, não fisiológicas, alteram e prejudicam a estrutura dos tecidos, acarretando uma maior rigidez muscular cardíaca, o que influencia diretamente a função ventricular, elevando significativamente o risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (AGÜERO et al., 2015; GARZA, 2015). O diagnóstico é feito com base no quadro clínico, nas alterações eletrocardiográficas e na elevação dos marcadores bioquímicos de injúria cardíaca (IBANEZ et al., 2018).

2.1.1 Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio

Sabe-se que a maioria das mortes por IAM ocorrem nas primeiras horas de manifestação clínica da doença, sendo 40% a 65% na primeira hora do início dos sintomas e cerca de 80% nas primeiras 24 horas. Sendo assim, um grande número de mortes por IAM acontecem fora do ambiente hospitalar, consequentemente desfavorecidas de um atendimento rápido e especializado que torna-se ser crucial para reversão do quadro clínico, uma vez que o efeito deletério da isquemia cardíaca é dependente da detecção rápida do início do evento (FERREIRA MAGEE et al.; LIBBY, 2013; NICOLAU et al, 2014). Para diagnóstico do IAM, os pacientes devem apresentar pelo menos duas das três condições estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde: dor precordial característica, alterações no eletrocardiograma (ECG) e elevação dos marcadores cardíacos (THYGESEN et al., 2012).

A dor precordial é caracterizada por um desconforto forte agudo com sensação de queimação na região retroesternal, podendo ter irradiação para o ombro e/ou braço esquerdo. É frequentemente acompanhada com sensação de náusea, vômitos e falta de ar. Entretanto a dor precordial por si só não é especificamente conclusiva para o IAM, podendo ser confundida com sintomas musculares, gastrointestinal, ou até mesmo outras patologias cardiovasculares como embolia pulmonar e pneumotórax (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2017; MORRONE; MORONE, 2018).

O ECG é um método diagnóstico bastante utilizado nas emergências cardiológicas devido seu fácil acesso e manuseio. O exame é realizado através de um aparelho que medirá impulsos elétricos do músculo cardíaco, fornecendo um traçado fisiológico característico, permitindo assim a identificação de uma possível cardiopatia (MANSUR et al., 2006). Quando há um evento isquêmico alterações no segmento ST, inversão da onda T e presença ou não de ondas Q patológicas podem ser observadas (RITA et al., 2016). Sabe-se que o ECG é uma das ferramentas de grande utilidade na triagem inicial de pacientes com suspeita de evento coronariano agudo, porém cerca de 50% dos pacientes com IAM não apresentam elevação do segmento ST no primeiro ECG, sendo necessário exames seriados. Portanto, este também não pode ser exclusivo ao diagnóstico do IAM (IBANEZ et al., 2018).

Assim, a próxima linha de investigação normalmente envolve a medição de biomarcadores cardíacos, tradicionalmente focada nas troponinas cardíacas e no CK-Mb (CORREIA et al., 2012; GODOY; BRAILE; PURINI NETO, 1998), sendo sua liberação na corrente sanguínea resultante da injúria cardíaca ao evento isquêmico. Os marcadores bioquímicos podem ser separados segundo seu processo fisiopatológico responsável por sua elevação sistêmica, dentre elas: a) isquemia miocárdica ou pré-necrose, como o H-FABP; b) necrose miocárdica, como a troponina, CK-Mb e mioglobina; c) estresse biomecânico, como peptídeo natriurético tipo B (BNP); d) ativação de processos inflamatórios endoteliais, como a cardiotrofina e a endotelina (DISEASE; SITUATIONS, 2015). Muitos destes marcadores são amplamente utilizados na prática clínica e estabelecem de forma rápida e efetiva a suspeita diagnóstica inicial do IAM. Porém, infelizmente, alguns não são tipicamente elevados até pelo menos 6-8 horas após o início da dor torácica, sendo assim se faz necessário de um biomarcador mais específico para o diagnóstico precoce do IAM.

2.1.2 H-FABP

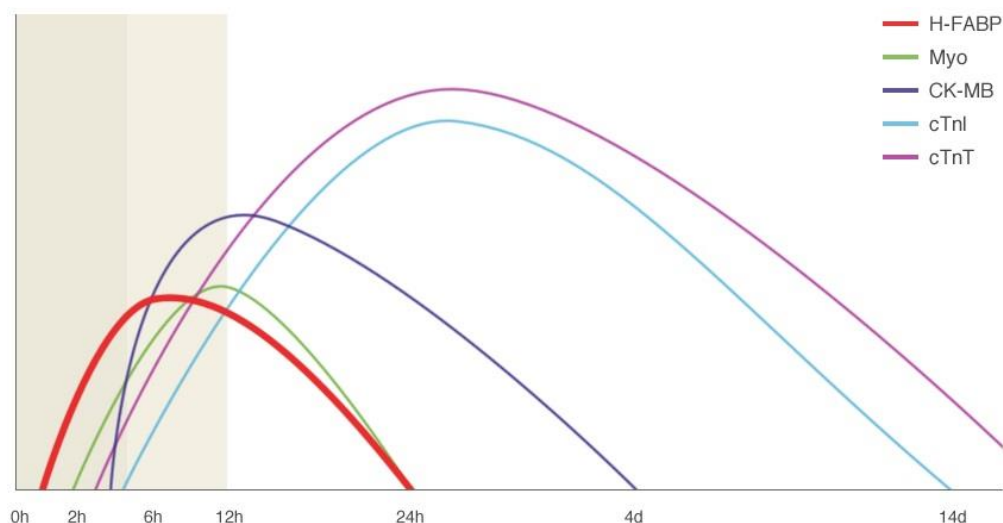
As proteínas de ligação de ácidos graxos (FABPs) são membros da família de proteínas de ligação a lipídios, que tem como principal função a regulação da absorção de ácidos graxos e do transporte intracelular. Até o momento, já foram

identificados 9 diferentes FABPs, com distribuição específica para tecidos, sendo eles: Proteínas de ligação a lipídios do coração, fígado, intestino, íleo, adipócito, testículos, cérebro, retina e mielina (CASTRO, 2004; CHMURZYŃSKA, 2006).

O H-FABP, sigla para *Heart-Type Fatty Acid Binding Protein*, é uma proteína citoplasmática de baixo peso molecular (15 kDa) extremamente abundante em células miocárdicas, cuja função fisiológica é transportar ácidos graxos a partir da membrana celular para as mitocôndrias. No IAM o H-FABP começa a ser liberado no plasma em menos de 30 minutos após a lesão do miocárdio (HOFFMANN et al., 2015b), atingindo pico de concentração plasmática entre 6-8 horas do início dos sintomas, e retornando à concentração normal dentro de 24-30 horas. Em adultos saudáveis a concentração sanguínea do H-FABP pode variar entre 0,0 e 5,5 ng / ml. (HOFFMANN et al., 2015). Uma vez que sua liberação na corrente sanguínea é rápida, viabiliza seu uso para o diagnóstico precoce do IAM (CAVUS et al., 2006). Além da sua utilidade para diagnóstico de doenças coronarianas, o H-FABP pode ser útil para detectar o estado funcional do miocárdio em outras condições como na insuficiência cardíaca congestiva, sepse e tromboembolismo pulmonar (DAS, 2016).

Embora o H-FABP tenha cinética de liberação semelhante à mioglobina, é aproximadamente 15-20 vezes mais específico para o IAM, tornando-o assim um biomarcador mais eficaz no diagnóstico (KAKOTI; GOSWAMI, 2013). Outro benefício da cinética de liberação do H-FABP após o IAM é que, uma vez que retorna às concentrações basais tão rapidamente, ele pode ser usado como um biomarcador para reinfarto após um IAM inicial. Historicamente o marcador de escolha é o CK-MB devido à sua depuração mais rápida do que a Troponina Cardíaca (3-4 dias e 10-14 dias, respectivamente), porém o H-FABP oferece uso potencial a partir do segundo dia em diante (COLLI et al., 2007).

Figura 2 - Gráfico de cinética de liberação dos marcadores cardíacos.



Fonte: H-FABP Biomarker of Myocardial Ischemia (2018).

Em seu estudo, Mc Cann e colaboradores (2008) demonstraram que a avaliação do H-FABP dentro das primeiras 4 horas do início dos sintomas foi superior à troponina cardíaca T (cTnT), mioglobina e CK-Mb para detecção do IAM. Além disso, destacaram que a combinação do H-FABP e cTnT juntos no momento da admissão hospitalar é útil e complementar no diagnóstico precoce do IAM (MCCANN et al., 2008).

Afim de comparar o desempenho diagnóstico do H-FABP com a última geração de Troponina Cardíaca T (hscTnT), foi realizado um estudo que teve como objetivo avaliar se o H-FABP poderia melhorar ainda mais a sensibilidade da hscTnT, bem como auxiliar na interpretação de hscTnT positivo devido a causas não-SCA (por exemplo, insuficiência cardíaca, miocardite). Como resultado, descobriram que embora a hscTnT ofereça excelente sensibilidade para o diagnóstico de IAM, é altamente propensa a falsos positivos devido a elevações não relacionadas à SCA. O H-FABP possui sensibilidade similar ao hscTnT, mas com o benefício adicional da redução de falsos positivos, especialmente em pacientes que vão à emergência hospitalar nas primeiras horas após o início da dor torácica (MCMAHON et al., 2012).

Atualmente pacientes com cTnT positiva são priorizados para angioplastia e os pacientes cTnT negativos são considerados de menor prioridade, podendo acarretar

em uma triagem errônea na prioridade. Sendo assim, a adição do teste H-FABP poderá ajudar a identificar os pacientes de alto risco, prioritários aos procedimentos cirúrgicos. No entanto, podem existir algumas limitações no uso desses valores do H-FABP como ferramenta diagnóstica, visto que cirurgias e insuficiência renal aguda podem superestimar seus valores reais. Sendo assim, faz-se necessária à associação do H-FABP com outros biomarcadores para um diagnóstico mais adequado do IAM (CHAN; NG, 2010).

2.1.2.1 Métodos diagnósticos do H-FABP

Atualmente no mercado existem kits de imunoensaio cromatográfico para testes rápidos de H-FABP. Estes testes fornecem uma determinação qualitativa de diagnóstico, em sua grande maioria o valor de corte é entre 7-10 ng/ml (CAVUS et al., 2006; HOFFMANN et al., 2015b). Uma das grandes vantagens desse tipo de teste é a rapidez com que o resultado apresentado, disponíveis cerca de 15-20 minutos (BOUWMAN, 2014). Apesar de serem práticos, rápidos e de custo reduzido, estes apresentam uma baixa sensibilidade diagnóstica e se limitam a fornecer resultados apenas qualitativos (sim ou não como resposta), o que dificulta correlacionar à extensão da lesão do músculo cardíaco, tornando-se uma análise de custo-efetividade desfavorável.

Outro tipo de teste existente para detecção do H-FABP são os ensaios baseados em métodos clássicos imunoenzimáticos (ELISA). O método ELISA é uma técnica imunológica quantitativa na qual a reação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac) é monitorizada por medições enzimáticas. É utilizada uma enzima para detectar a ligação Ag-Ac, na qual a mesma converterá o substrato num produto colorido, indicando a presença ou não da ligação Ag-Ac (CAVALCANTE et al., 2017). Estudos atuais também utilizam um valor de corte de 7 ng / ml, idêntico aos imunocromatográficos (BANK et al., 2016). Devido ao ELISA ser um método demorado e os imunoensaios cromatográficos terem baixa especificidade diagnóstica (43%) (BANK et al., 2016; COLLI et al., 2007), os ensaios H-FABP atuais têm uso limitado (CAVUS et al., 2006). Neste sentido, o desenvolvimento de

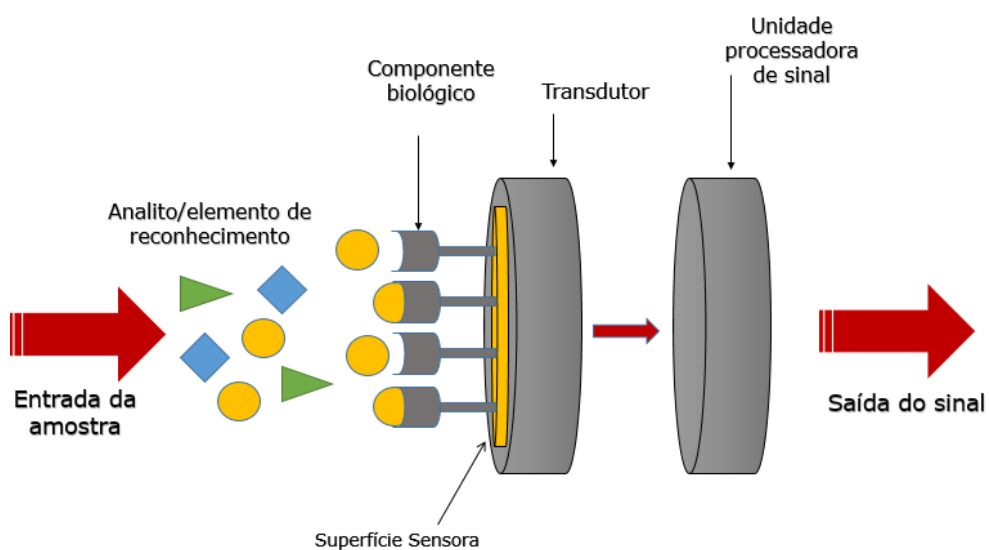
biossensores é de suma importância, uma vez que são testes rápidos, práticos e quantitativos.

2.2 BIOSSENSORES

Avanços recentes no campo do diagnóstico em saúde estão ampliando as possibilidades de uso de biossensores no diagnóstico e na prevenção de doenças. Desenvolvidos com base em elementos de reconhecimento biológico, como antígenos e anticorpos, esses dispositivos podem se tornar aparelhos portáteis e baratos, semelhantes aos utilizados na medição das taxas de glicose no sangue (TELES, 2006).

Os biossensores são dispositivos analíticos capazes de converter uma reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico mensurável e quantificável (KARUBE; NOMURA, 2000). Estruturalmente são construídos a partir de um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal (MIRANDA, 2014), como descrita na Figura 3. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que irá gerar um sinal, o qual será convertido (transdutor) e processado (LEE et al., 2008).

Figura 3 - Esquema básico de um biossensor.



Fonte: A Autora (2019).

Em sua superfície sensora, os biossensores contêm como espécies imobilizadas elementos de reconhecimento necessários para detecção do analito alvo. Estas podem ser: tecidos celulares, microrganismos, organelas, membranas, enzimas ou anticorpos (WILSON; GIFFORD, 2005). Após o analito ser detectado, o transdutor atua como uma interface, mensurando as mudanças física ou química que ocorre na reação, transformando-a em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz (LEE et al., 2008; MEHRVAR et al., 2000). Existem diversos tipos de transdutores no qual são aplicados aos biossensores, a escolha dependerá da amostra à ser analisada ou do tipo de componente biológico à ser imobilizado na superfície sensora.

2.2.1 Métodos de transdução

O transdutor é o componente do sensor capaz converter os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis, agindo como interface medindo as mudanças físicas ou químicas da reação com o biorreceptor. Podem ser classificados de acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, sendo: 1) Eletroquímicos, baseados em medidas de variação de propriedades elétricas durante a interação analito-biorreceptor, como corrente, potencial, condutividade e impedância elétrica 2) Piezelétricos, baseados nas análises das variações de frequência geradas pelas oscilações de um cristal (PAVEY; HUNTER; PAUL, 2003); 3) Óticos, baseados na medição da luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica (TANG et al., 2006) e 4) Calorimétricos, que usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas para medir a concentração do analito (CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Seu mecanismo, juntamente com o material biológico, deve detectar apenas o analito ou produto específico, não respondendo a outras substâncias presentes na amostra a ser analisada. Dentre os transdutores, os eletroquímicos apresentam vantagens, tais como: especificidade, estabilidade, baixos limites de detecção, fácil manejo e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação de sensores portáteis (CORRÊA et al., 2018; GRIESHABER et al., 2008).

2.2.2 Imunossensores

Os imunossensores pertencem à classe dos biossensores eletroquímicos que se baseiam na reação de interação antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) imobilizados na plataforma sensora. Esta interação forma um complexo Ag-Ac, gerando alterações físico-químicas como ligações não covalentes, ligação eletrostática, ponte de hidrogênio e ligações hidrofóbicas (FARRÉ; KANTIANI; BARCELÓ, 2007). As ligações ocorrem à curta distância fazendo com o que só as moléculas que contém o determinante antigênico se liguem ao sítio de antígeno ligante do respectivo anticorpo (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999a). A alta especificidade do acoplamento Ag-Ac fornece um complexo estável, permitindo assim alcançar baixos limites de detecção (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999b; SILVA JÚNIOR, 2010).

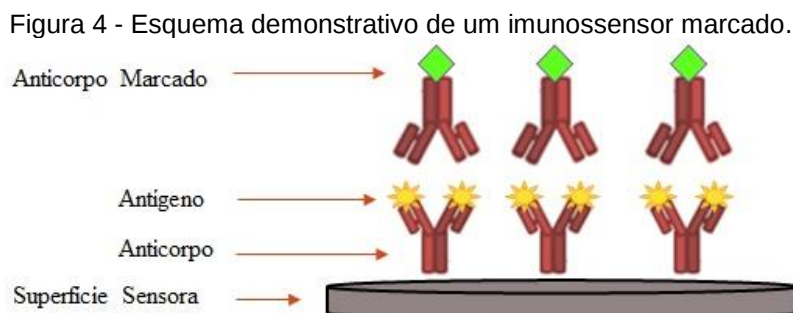
Quanto a especificidade, há uma estreita relação de complementaridade entre os componentes estruturais tridimensionais das duas moléculas, possibilitando uma máxima aproximação entre os sítios de ligação das moléculas de epítopos dos antígenos. Como vantagem, a dissociação do complexo antígeno-anticorpo é reversível podendo ser feita por diferentes processos tais como: calor, modificação do pH, força iônica e solventes orgânicos (LIN, WEI & CHU, 2012) possibilitando assim, reutilizar em novos experimentos.

2.2.3 Tipos de detecção em imunoensaios

A depender do tipo de resposta desejada, os imunossensores são classificados em marcados (medição indireta) e não marcados (medição direta), ou seja, o dispositivo pode detectar diretamente a interação Ag-Ac, ou pode detectá-lo por meio do reconhecimento de um marcador que irá sinalizar o local onde ocorreu a formação do complexo biológico (RAPP; GRUHL; LÄNGE, 2010).

Os imunossensores marcados seguem o princípio dos imunoensaios dos tipos competitivo e sanduíche, tendo como objetivo marcar o elemento de reconhecimento biológico para quantificar o analito detectado durante a fase de incubação (SYAHIR et al., 2015). Para isso são utilizadas moléculas fluorescentes, quimioluminescentes e nanopartículas como marcadores. Há uma interação com o analito (antígeno) formando o imunocomplexo e em seguida são adicionados anticorpos marcados por

enzimas ou moléculas capazes de sofrer oxidação e redução que serão responsáveis pela geração do sinal, como demonstrado na figura 4 (ZANATO, 2016).



Fonte: Adaptado de Zanato (2016).

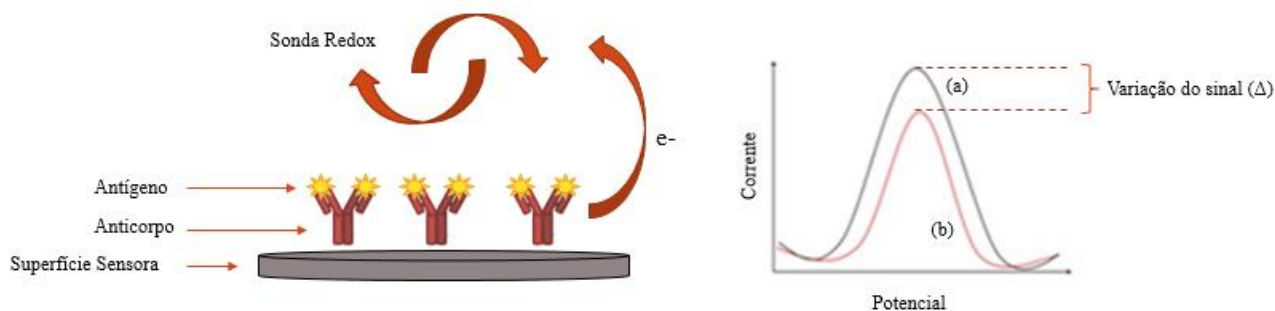
Apesar de seletivo e com grande potencial para detecção de baixas concentrações, este método resulta em elevados custos operacionais, incluindo tempo de ensaio mais longo com o aumento das etapas de processamento da amostra (GOPINATH et al., 2014).

2.2.3.1 Imunossensores não marcados

Os sensores não marcados (do inglês, *label-free*), reconhecem a formação do imunocomplexo na superfície do transdutor em sonda redox, sem a utilização de anticorpos ou antígenos conjugados a enzimas, nanopartículas ou a radioisótopos (RAPP; GRUHL; LÄNGE, 2010; SANG et al., 2016). Apresentam como vantagem a simplicidade de operação pelo fato de dispensarem reagentes adicionais para a marcação e a possibilidade de detecção em etapa única, favorecendo assim seu uso em testes rápidos e portáteis (SYAHIR et al., 2015). Neste formato de teste direto, a resposta do sinal muda no momento em que as moléculas do analito se ligam a superfície do transdutor, utilizando propriedades biofísicas moleculares, como peso molecular, índice de refração e carga molecular para acompanhar presença ou atividade molecular (SOLER; HUERTAS; LECHUGA, 2018). A principal vantagem da detecção *label-free* é a obtenção de informações mais diretas, já que os métodos usam apenas proteínas e ligantes nativos (HAJI-HASHEMI et al., 2019; TOMIZAKI; USUI; MIHARA, 2010).

Atualmente, a tendência das técnicas de medição direta tem sido demandada devido avanços tecnológicos destinado aos biossensores (SANG et al., 2016). Assim, os imunossensores eletroquímicos não marcados surgem como forma de progresso, permitindo uma melhoria na sensibilidade, baixo consumo de amostras e baixo dano ao analito. Usualmente são utilizadas técnicas eletroquímicas tais como voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e pulso diferencial para as medidas analíticas que utilizam sondas redox na geração de espécies eletroativas (PACHECO et al., 2013). Nestas técnicas inicialmente é feito a medida do pico base, referente a resposta eletroquímica da sonda empregando o imunossensor contendo apenas o anticorpo ou o antígeno imobilizado (Figura 5 (a)), e, após a incubação com o analito uma nova medida é registrada como apresentada na Figura 5 (b). A formação do imunocomplexo pode ser observada pela diferença do sinal em relação ao sinal inicial (pico base). Esta diferença de amplitude do sinal é proporcional a concentração do analito, que em geral, reduz a transferência de carga na superfície sensora (SOLER; HUERTAS; LECHUGA, 2018).

Figura 5 - Esquema demonstrativo de um imunossensor não marcado.



Fonte: Adaptado de Zanato (2016).

Embora este sistema apresente vantagens quando comparado com os imunossensores marcados, entretanto no uso de detecção de anticorpos ou antígenos em amostras complexas, como soro, a simplicidade do formato de teste direto pode se tornar uma desvantagem considerável pois alguns componentes não analisados na matriz da amostra também podem se ligar à superfície do sensor, levando a resultados falso-positivos.

Recentemente, estudos vêm sendo focados em plataformas isentas de sonda redox, nas quais os compósitos desenvolvidos atuam como sondas redox, permitindo leituras diretas no sangue ou soro (MOREIRA et al., 2018). Nesse sentido, moléculas ativas redox, como o azul de metileno, podem ser conectadas à superfície do sensor como o centro da atividade eletroquímica, dispensando o uso de sonda redox externa (YAMANAKA; VESTERGAARD; TAMIYA, 2016). A eletroquímica dos corantes fenotiazínicos é bem conhecida, e eles são capazes de fornecer ao sensor uma melhor estabilidade e sensibilidade (ZHANG; XU, 2014).

2.2.4 Técnicas eletroquímicas

Os métodos eletroanalíticos fazem uso de fenômenos químicos associados à transferência de elétrons que ocorrem na superfície do eletrodo, possibilitando o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito alvo e suas propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência e carga elétrica (PACHECO et al., 2013). Em geral, as diferentes técnicas eletroquímicas utilizam um sistema tri-eletródico, sendo composto por: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. Estes eletrodos são submersos em uma célula contendo a solução da espécie eletroativa com um excesso de um eletrólito não reativo (eletrólito suporte), responsável por garantir o controle difusional das espécies (ALEIXO, 2003; ASIF et al., 2018). As informações sobre o analito de interesse são obtidas por meio da medição da extensão da corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (CABRAL et al., 2003).

Dentre as técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada são as mais indicadas para a caracterização das plataformas biossensores pois permitem analisar separadamente cada etapa de modificação da superfície eletródica em resultado dos parâmetros elétricos.

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, onde a corrente é medida antes do

pulso ser aplicado e no final do pulso (PACHECO et al., 2013). Estas correntes são subtraídas e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado, gerando um voltamograma com a forma de uma curva gaussiana (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Nesta técnica uma onda quadrada simétrica de amplitude sobreposta é aplicada ao eletrodo de trabalho. A corrente é representada duas vezes, uma ao final do pulso direto e outro ao final do pulso reverso. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida. O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado (ALEIXO, 2003). Como vantagem, pode ser usada para realizar experimentos de maneira mais rápida quando comparada a técnica de pulso diferencial (PACHECO et al., 2013).

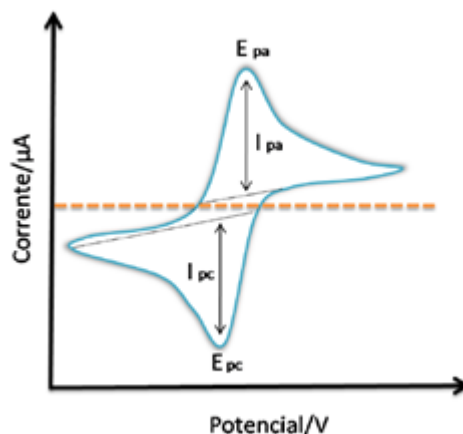
2.2.4.1 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é a técnica mais usualmente escolhida na área da química eletroanalítica quando quer se obter informações a respeito de processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica é decorrente de sua característica de fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (WANG, 2001). 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 (BRETT, 1993).

Na VC, as informações obtidas 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, gerando alterações na dupla camada do eletrodo após aplicação do potencial, que declina rapidamente (PACHECO et al., 2013). Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os

potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) e a área eletroativa resultante (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, 2002) , como descritos na Figura 6. Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons.

Figura 6 - Representação gráfica da técnica de VC.



Fonte: Adaptado de Wang (2001).

2.2.5 Materiais empregados na superfície sensora

A etapa mais importante no desenvolvimento do imunossensor é a imobilização do analito alvo na superfície do eletrodo. Este processo exige a preservação da estabilidade e da atividade biológica das biomoléculas, bem como a sua orientação, distribuição, e proximidade com a superfície do eletrodo (ZANATO, 2016). Neste contexto, um dos grandes desafios no desenvolvimento de imunossensores tem sido a garantia de reprodutibilidade e aumento da sensibilidade diagnóstica. Recentemente, as excelentes propriedades físicas do uso de nanomateriais, como a alta relação superfície/volume, excelente biocompatibilidade e boa condutividade, têm atraído grande atenção devido às possíveis aplicações destas plataformas no processo de imobilização, garantindo a atividade catalítica das biomoléculas e o aumento do limite de detecção (AMANI; KHOSHROO; RAHIMI-NASRABADI, 2018). Processos físico-químicos permitem que estes nanomateriais sejam funcionalizados de modo a introduzir grupos reativos que possibilitem o acoplamento mais estável de proteínas, através de ligações covalentes (TÎLMACIU; MORRIS, 2015). Estes materiais podem promover o aumento da área reativa, e, conseqüentemente, da

quantidade de moléculas imobilizadas e ampliar a transferência de elétrons, contribuindo para um aumento da sensibilidade na detecção do evento de reconhecimento (LI et al., 2012; MISTRY et al., 2014). Assim, seu uso tem conferido resultados mais reprodutíveis e sensíveis.

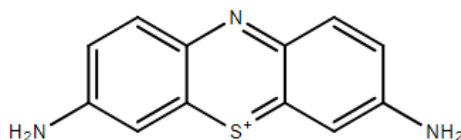
Os NTC, descritos originalmente em 1991 por Sumio Iijima, são constituídos de folhas de grafeno enroladas, de formato cilíndrico, com arranjos hexagonais de carbono, variando o tamanho de seu diâmetro de nanômetros a centímetros. São divididos em dois tipos, nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, do inglês "*Single-Walled Carbon Nanotubes*") ou múltiplas camadas (MWCNTs, do inglês "*Multi-Walled Carbon Nanotubes*") (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; DE HEER, 2002). Dentre uma variedade de nanomateriais, os NTCs frequentemente se tornam a escolha para a fabricação de biossensores devido às suas qualidades e propriedades físico-químicas. Possuem uma boa estabilidade química, resistência mecânica e uma e propriedades de condutividade elétrica (PUMERA, 2007). Devido sua capacidade de mediar a transferência de elétrons, proporcionar aumento da área de ancoragem de biomoléculas e uma diminuição no tempo de resposta do biossensor (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2018; ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

Para a escolha do suporte de imobilização das biomoléculas devem ser levadas em consideração algumas propriedades, tais como: resistência, grau de porosidade, grupos funcionais suscetíveis à modificação e estabilidade mecânica (YOO; LEE, 2010). Dentre os materiais de estrutura para imobilização destacam-se os PCs, que integram os sinais químicos produzidos pelos elementos de detecção transmitindo-os na forma de sinal elétrico (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Os PCs possuem propriedades elétricas e ópticas semelhantes às dos metais e semicondutores inorgânicos, mas também exibem as propriedades atrativas associadas aos polímeros convencionais, como facilidade de síntese e processamento (ATES, 2013). Essa combinação de propriedades deu a esses polímeros uma ampla gama de aplicações na indústria de microeletrônica, incluindo seu uso no campo biológico. Pesquisas com PCs em aplicações biomédicas cresceram com a descoberta, na década de 1980, de que esses materiais eram compatíveis com muitas moléculas biológicas, como as usadas em biossensores (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

A maioria dos PCs apresentam várias vantagens importantes para aplicações biomédicas, incluindo biocompatibilidade, capacidade de aprisionar e liberar moléculas biológicas controláveis e capacidade de transferir carga de uma reação bioquímica (GRACIA; MECERREYES, 2013). Entre os polímeros mais usados encontram-se a politionina (Pth), polipirrol (Ppy) e a polianilina (PANI). Seu uso permite controlar as propriedades da superfície sensora e funcionalizá-las, devido seus grupos funcionais na estrutura do polímero, como por exemplo os grupos aminos nos filmes de politionina possibilitando um melhor acoplamento covalente com biomoléculas (FERREIRA, 2011).

A tionina (TN) é um corante catiônico derivado de fenotiazina que contém dois grupos amino nas posições α do anel fenotiazínico (Figura 7). Devido ao átomo de enxofre em sua estrutura, a TN é comumente utilizada para modificação de superfícies metálicas em biossensores, pois facilita a eletropolimerização através da interação Metal-S (GHICA; FERREIRA; BRETT, 2015).

Figura 7 - Estrutura química do monômero de Tionina.



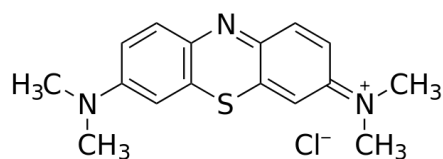
Fonte: Adaptado de Owino (2008).

Em virtude da presença de grupos doadores de elétrons, o mecanismo da eletropolimerização da TN ocorre através da oxidação irreversível do monômero à valores de potencial elevados, com a formação de um radical estável e monocarregado (GYÖRGY INZELT, 2008). A estrutura do polímero resultante (Pth) tem sido descrita como formada por unidades monoméricas ligadas via pontes amina secundária na posição para e contendo grupos aminas livres na sua estrutura favorecendo a funcionalização através de substâncias orgânicas (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

Atualmente a tendência no desenvolvimento de biossensores mais arrojados, é o uso de corantes enquanto mediadores de reação redox, como o MB, devido propriedades eletrocatalíticas (LI et al., 2012). O MB pode fornecer ao sensor uma

melhoria na transferência de elétrons entre o centro redox de um composto à superfície do eletrodo de trabalho (OLIVEIRA et al., 2011). Devido suas propriedades eletrocatalíticas, tem sido desenvolvidos estudos visando sua aplicação como sonda na preparação de eletrodos quimicamente modificados (FERAPONTOVA; GOTHELF, 2009; MOREIRA et al., 2018; YANG et al., 2002).

Figura 8 - Estrutura química do Azul de Metileno.



Fonte: Adaptado de Yan (2005).

3 OBJETIVO

Desenvolver uma plataforma sensora nanoestruturada para detecção eletroquímica do H-FABP.

3.1 ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma plataforma sensora amino reativa empregando eletrodo de ouro modificado com filme de politionina, nanotubos de carbono e azul de metileno visando à aplicação em ensaios eletroquímicos;
- Imobilizar anticorpos anti-H-FABP sobre a plataforma sensora;
- Caracterizar as etapas de formação de filme e imobilização de biomoléculas por técnicas eletroquímicas;
- Otimizar os parâmetros experimentais para determinação do H-FABP, tais como, concentração de anticorpo;
- Estabelecer uma curva de resposta analítica do imunossensor para determinação do H-FABP, empregando a técnica de voltametria cíclica;

4 RESULTADO

O resultado da pesquisa gerou um artigo à ser submetido ao *Research on Biomedical Engineering* (ISSN 2446-4740 / 2446-4732), jornal oficial da Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica.

4.1 IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO DO H-FABP: UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Cecília M. Prado^(a), Paula A.B. Ferreira^(a), Rosa F. Dutra^(a).

^(a) Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente

Prof^a Dr^a Rosa Amália Fireman Dutra

E-mail: rosa.dutra@ufpe.br

Fone/Fax: +55 81 21267325 / 21268000

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,7 milhões de óbitos por ano. Nos últimos anos, o H-FABP vem sendo utilizado como importante marcador no diagnóstico do IAM, mostrando-se superior às troponinas por aparecer mais precocemente, até as duas primeiras horas do ataque cardíaco. A demanda por testes rápidos para H-FABP tem levado, inicialmente, ao desenvolvimento de testes de tira lateral, comercialmente disponíveis, e a busca por testes mais acurados e quantitativos, os imunossensores.

O uso de nanomateriais, aliado a polímeros condutores tem resultado numa performance analítica aumentada, devido à alta transferência eletrônica resultante do sinergismo entre esses materiais. Recentemente, o uso de nanomateriais de carbono funcionalizados por mediadores químicos de propriedades redox estáveis tem aperfeiçoado as respostas dos sensores eletroquímicos amperométricos, por aumento nas respostas de corrente faradaicas. Aqui, um imunossensor eletroquímico baseado em filme de politionina (PTh) e nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados com azul de metileno (MB) foi desenvolvido para detecção do H-FABP. A resposta amperométrica foi obtida por voltametria cíclica, mostrando respostas lineares e limites de detecção para o H-FABP, respectivamente, entre 2,5 a 25,0 ng/mL e 3,1 ng/mL em amostras tamponadas; e entre 5,0 a 25,0 ng/mL e 4,5 ng/mL em soro humano. A boa reprodutibilidade e a faixa clínica obtida com esse imunossensor suportam sua utilidade como uma ferramenta potencial para testes de diagnóstico precoce do IAM, com a vantagem de ser um método passível de portabilidade como os testes de tira lateral.

PALAVRAS-CHAVES: Imunossensor, Nanotubos de Carbono, H-FABP, Infarto Agudo do Miocárdio.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, incluindo o infarto agudo do miocárdio (IAM), representam um importante problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte em todo o mundo (BAENA et al., 2012; WHO, 2017). Diferenciar com segurança pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) de pacientes com dor torácica não isquêmica é o um dos grandes desafios, especialmente quando o diagnóstico precisa ser realizado em pacientes que não apresentam sintomas clínicos típicos ou eletrocardiograma (ECG) característico de lesão miocárdica aguda (MIRANDA SILVA; GONTIJO DA SILVA, 2018). Por mais que o ECG seja a primeira ferramenta diagnóstica para a detecção do infarto agudo do miocárdio (IAM), este não possui uma boa sensibilidade diagnóstica (~50%) e, portanto, não pode ser exclusivo ao diagnóstico do IAM (SANTOS et al., 2018; SBC- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, [s.d.]). Vários marcadores bioquímicos são

utilizados para auxiliar no diagnóstico do IAM tendo como função a estratificação de risco e auxílio na escolha do tratamento adequado.

Os biomarcadores cardíacos são componentes de estruturas celulares liberados na circulação quando ocorre lesão no miocárdio, sua quantificação no soro sanguíneo são relevantes devido à obtenção de informações associadas à severidade e o estágio da lesão cardíaca (BRIEGER et al., 2004; MIRANDA; LIMA, 2014; RESENDE et al., 2015). Recentemente, a proteína de ligação de ácidos graxos do coração (H-FABP) vem sendo apontada como um eficiente marcador precoce de isquemia miocárdica, podendo ser associado às troponinas cardíaca (cTnI e cTnT) para um diagnóstico mais preciso do IAM (GURURAJAN et al., 2010). Após a lesão do miocárdio, o H-FABP é liberado na corrente sanguínea entre 20-30 minutos, sendo útil no diagnóstico precoce do IAM (CAVUS et al., 2006; HOFFMANN et al., 2015a).

Dado que o uso do H-FABP como ferramenta diagnóstica para o IAM é um teste recente, a introdução da sua dosagem na prática clínica através de imunoensaios tem possibilitado a detecção precoce de alterações na corrente sanguínea (REDA; MOHARRAM; SOLIMAN, 2016). Atualmente no mercado existem ensaios baseados em métodos clássicos, como o ELISA, que são testes com boa especificidade e resposta analítica bem estabelecida, porém limitada para aplicação como testes à beira-leito pois necessitam de aparato técnico específico e demanda certo tempo para ser revelado além de necessitar de equipe técnica especializada (CAVALCANTE et al., 2017; GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999a). Em contra partida, sistemas mais práticos e portáteis para determinação do H-FABP à beira leito têm sido desenvolvidos empregando testes de tira com fluxo lateral baseados em imunoensaios cromatográficos (REGAN; O'KENNEDY; COLLINS, 2018). Embora simples, os testes apresentam apenas informações qualitativas, tendo baixa sensibilidade no geral, tendo assim seu uso limitado (OTAKI; WATANABE; KUBOTA, 2017). Portanto, o desenvolvimento de testes rápidos e quantitativos que auxiliem num diagnóstico precoce para uma rápida intervenção apresenta-se como imperativo.

Nos últimos anos, os biossensores têm se revelado como um excelente sistema de diagnóstico rápido devido sua alta sensibilidade, praticidade e

possibilidade de análise em tempo real (REGAN; O'KENNEDY; COLLINS, 2018). Atualmente, a tecnologia oferecida pelos biossensores vem possibilitando o desenvolvimento de dispositivos do tipo testes de pronto atendimento, do inglês "*point-of-care testing*" (POCT), um método analítico que possibilita acelerar o tempo de resposta do diagnóstico, sendo uma alternativa atrativa para uma tecnologia à beira do leito (SYEDMORADI et al., 2017). Um dos grandes desafios no desenvolvimento desses sensores consiste em concomitantemente: detecção de analito em baixas concentrações, promover uma rápida reposta, alcançar boa especificidade e fazer uso de tecnologias facilmente portabilizadas (KOKKINOS. et al 2016; REGAN; O'KENNEDY; COLLINS, 2018; WAN et al., 2013).

A etapa mais importante no desenvolvimento do imunossensor é a imobilização do analito alvo na superfície do eletrodo. Este processo exige a preservação da estabilidade e da atividade biológica das biomoléculas, bem como a sua orientação, distribuição, e proximidade com a superfície do eletrodo (ZANATO, 2016). Recentemente, as excelentes propriedades físicas dos nanomateriais, como a alta relação superfície/volume, biocompatibilidade e boa condutividade, têm atraído grande atenção devido às possíveis aplicações destas plataformas no processo de imobilização, garantindo a atividade catalítica das biomoléculas e o aumento do limite de detecção (AMANI; KHOSHROO; RAHIMI-NASRABADI, 2018). A conjugação de nanomateriais à polímeros condutores (PCs), contribuem e otimizam a resposta sensora pois fornecem um melhor controle das propriedades da superfície e funcionalização, como por exemplo os grupos aminas nos filmes de politionina, tais quais possibilitam um melhor acoplamento covalente à biomoléculas (FERREIRA, 2011).

A maioria dos PCs apresentam vantagens para aplicações biomédicas, sendo elas: biocompatibilidade, capacidade de aprisionar e liberar moléculas biológicas controláveis e capacidade de transferir carga de uma reação bioquímica (GRACIA; MECERREYES, 2013). Entre os polímeros mais usados encontram-se a politionina (PTh), polipirrol (Ppy) e a polianilina (PANI). Filmes de politionina (PTh) têm sido bastante utilizados em sensores eletroquímicos por apresentarem propriedade atrativas, tais como alta condutividade, estabilidade e fácil preparação (XU et al., 2010). Além disso, quando utilizadas superfícies metálicas, a

eletrodeposição da tionina é facilitada pela forte interação Metal-S devido seu átomo de enxofre em sua estrutura química (GHICA; FERREIRA; BRETT, 2015). Recentemente, o uso de nanomateriais de carbono funcionalizados por mediadores químicos de propriedades redox estáveis tem aperfeiçoado as respostas dos sensores eletroquímicos amperométricos, por aumento nas respostas de corrente faradaicas (LI et al., 2012). O azul de metileno (MB) é um mediador químico fenotiazínico com propriedades redox, que pode fornecer ao sensor uma melhoria na transferência de elétrons, promovendo consequentemente um aumento substancial na capacidade de armazenamento de carga (OLIVEIRA et al., 2011). Devido tais propriedades do MB, estudos têm sido desenvolvidos visando sua aplicação como sonda na preparação de eletrodos quimicamente modificados (FERAPONTOVA; GOTHELF, 2009; MOREIRA et al., 2018; YANG et al., 2002).

Atualmente nenhum imunossensor para o H-FABP está disponível comercialmente. Na plataforma proposta, um filme polimérico de politionina e nanomateriais conjugado a um mediador com características redox intrínsecas foi desenvolvido para detecção do H-FABP, um importante marcador precoce do IAM. O emprego de nanoestruturas aliada a técnicas de imobilização, favoreceram a seletividade das reações entre o anticorpo e o antígeno, resultando em um imunossensores sensível e estável.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

As proteínas recombinantes humanas do H-FABP e os anticorpos monoclonais anti-H-FABP foram compradas da AbcamTM (Cambridge, Inglaterra), bem como as amostras de soro humana que foram adquiridas da Sigma-AldrichTM (St. Louis, MO, EUA). Os monômeros de acetato de tionina, azul de metileno (MB), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), etilenodiamina 98% puro (EDA) e polissulfonato de sódio (PSS) foram obtidos da Sigma-AldrichTM (St. Louis, MO, EUA). Os nanotubos de carbonos funcionalizados

com grupamentos carboxílicos (NTC-COOH), 95% puros, foram obtidos da Dropsens™ (Oviedo, Espanha).

A solução tampão de fosfato salino (PBS) (0,01 M, pH 7,4) foi utilizada em todos os experimentos para diluição de amostras biológicas, sendo preparada por dissolução de 0,2 g de KCl, 8,0 g de NaCl, 0,24 g de KH_2PO_4 e 1,44 g de Na_2HPO_4 , em 1000 ml de água pura obtida de unidade de osmose reversa (Human RO 180). A glicina foi comprada da Fluka Analytical, o H_2SO_4 e ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) da Química Moderna, e o ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) da Vetec (Brasil).

2.2. Medidas eletroquímicas e equipamentos

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando o potenciostato Autolab PGSTAT204 (Eco Chemie, Holanda), controlado pelo software Nova 2.1.3® aquisição e processamento de dados. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um sistema convencional de três eletrodos, composto de eletrodo convencional de ouro policristalino (EAu) de seção circular de diâmetro de 0,8 mm como eletrodo de trabalho, eletrodo Ag/AgCl (KCl sat) como eletrodo de referência e fio de platina helicoidal como contra-eletrodo numa célula eletroquímica de 5 mL. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em presença de sonda redox, solução de ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)/ ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) à 5mM.

Para eletrossíntese do filme politionina (PTh) sobre a superfície do eletrodo de ouro (EAu) foi utilizada a técnica de voltametria cíclica com velocidade de varredura de 100 mV/s, em janela potencial entre -0,5 a 0,9V, durante 30 ciclos. As respostas sensoras e a caracterização eletroquímica das etapas de modificações da superfície sensora foram obtidas empregando-se a técnica de voltametria cíclica (VC), com janela de potencial de -0,8V a 0,8V a uma velocidade de varredura de 30 mV/s. Os dados para a construção dos gráficos e as curvas analíticas foram processados pelo software Origin Lab™, versão 8.0.

2.3. Preparação do filme de PTh

Previamente às etapas de montagem do filme, a superfície do EAU foi submetida a um procedimento mecânico de limpeza realizado por polimento em pasta de alumina ($0.3\mu\text{g}$), realizando movimentos em forma de infinito (∞) durante 2 min. Para verificação da remoção de resíduos da superfície eletródica foram registrados voltamogramas cíclicos em sonda redox de $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) / (\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$ à 5mM, no qual foram analisadas as diferenças entre as voltagens de pico anódico e catódico (E_{pa} e E_{pc} , respectivamente), bem como comparado o valor da corrente anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc} , respectivamente). Após a limpeza, o EAU foi imerso em uma célula eletroquímica contendo solução de 0,1 mM de monômeros de tionina em 10mM de PBS (pH 7,4), e submetido à eletrossíntese pela técnica de voltametria cíclica previamente descrita.

2.4. Montagem de nanoestruturas sobre filme de PTh

Posteriormente, o filme nanoestruturado foi montado por “*dropcasting*” sobre a superfície eletródica, no qual continha NTCs funcionalizados com azul de metileno (NTC@MB). Para obtenção do composto NTC@MB, inicialmente, 1 mg de NTC-COOH foi disperso em uma solução aquosa de 1mg/mL de PSS, no qual foi levada a um banho ultrassônico por 2 horas. Em seguida, esta suspensão foi conduzida à estufa, em temperatura de 50°C , num período de 15 horas (ZHANG; XU, 2014). Após esta etapa, a solução contendo NTCs ativados com o PSS foi centrifugada a uma velocidade de 15000 rpm por 45 minutos. Por fim, foi retirado o sobrenadante e os NTCs foram ressuspensos em 1 mL de MB a 10 mM (YAN et al., 2005). Este composto formado de NTC@MB foi sonificado por 02 horas e submetido à exaustivas lavagens em centrifuga a 15.000 rpm, até que o sobrenadante estivesse transparente indicando que o excesso de MB não ligado foi retirado.

2.5. Imobilização do anti-H-FABP e bloqueio de ligações não específicas

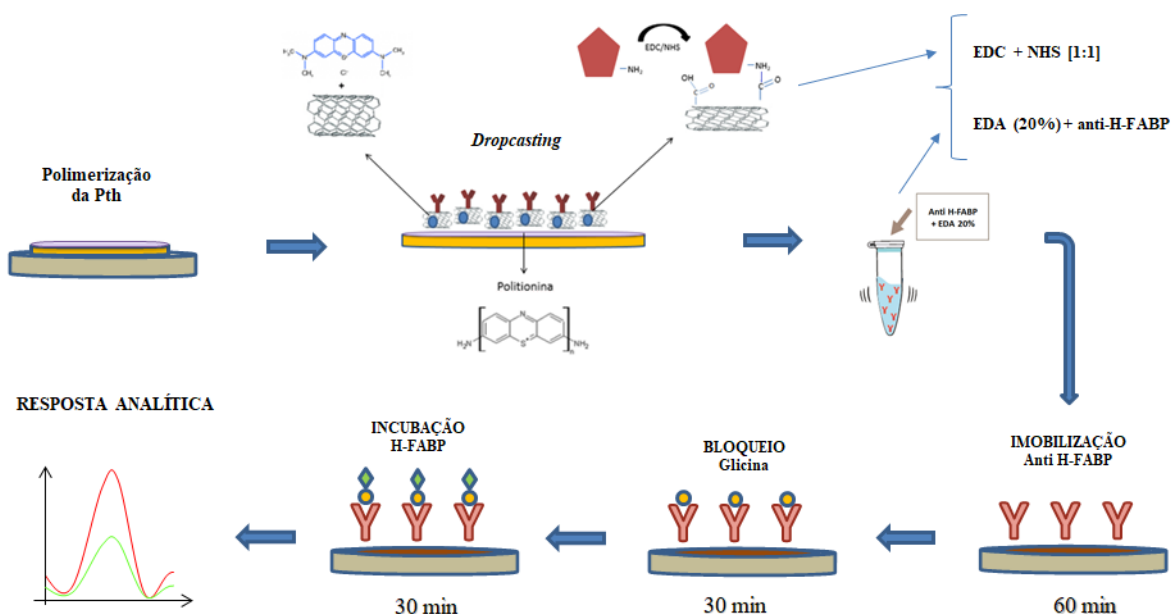
Após a modificação eletródica obtida pela montagem, inicialmente pelo filme de PTh seguida da incorporação de NTC@MB (EAU/PTh/NTC@MB), foi realizada a imobilização dos anticorpos anti-H-FABP. Para tal, uma mistura de 20mM de EDC e

50mM de NHS [1:1] em tampão PBS (pH 7,4) foi deixada em repouso sobre o eletrodo em temperatura ambiente por 40 minutos afim de ativar os grupos carboxílicos da plataforma sensora. Concomitantemente, uma mistura contendo 5 µl de EDA (20%) e 10 µl de anti-H-FABP (20 µg/ml) foi deixada em repouso por 40 min, sendo posteriormente depositada sobre o eletrodo para imobilização durante 60 minutos. Após, o eletrodo foi exaustivamente lavado em água, para remover o excesso não ligado, e passou pela etapa de bloqueio com glicina (100mM), em solução PBS (pH 7,4) incubado por 30 minutos e novamente lavados com água pura resultando em sucessivas camadas reativas (EAu/PTh/NTC@MB/Anti-H-FABP/Glicina).

2.6. Obtenção de respostas analíticas

O imunossensor foi submetido à prova com amostras de H-FABP incubadas durante 30 min, em diferentes concentrações. Antes da leitura da corrente resultante, a superfície do eletrodo foi lavada exaustivamente com PBS (pH 7,4), afim de retirar o excesso da amostra não ligada aos anticorpos da plataforma. Um resumo de todas as etapas envolvidas na construção do imunossensor e o ensaio de imunocomplexação está esquematizado na Figura 1.

Figura 1. Resumo gráfico esquemático da montagem do imunossensor e imunoensaio indicando medidas analíticas com VC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

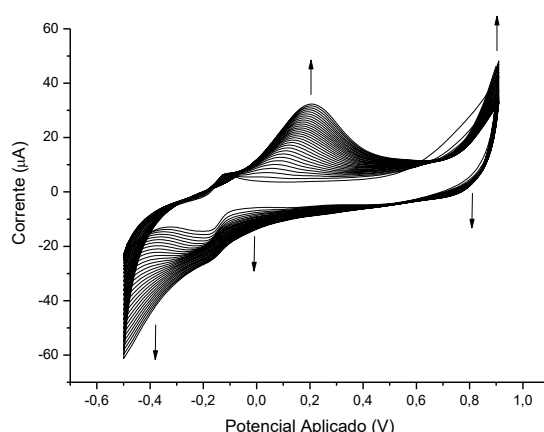
3.1. Eletrossíntese do filme de PTh

A eletropolimerização realizada em solução de monômeros de tionina renderam filmes de PTh sobre a superfície do sensor firmemente aderidos devido à estrutura possuir o enxofre ligado ao anel aromático, favorecendo assim sua adesão à estruturas metálicas (GHICA; FERREIRA; BRETT, 2015). É conhecido que os filmes finos poliméricos da tionina introduzem centros redox altamente estáveis, eletroativos e eficientes. Essas propriedades de superfície catalíticas podem facilitar aplicações em biossensores enzimáticos (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014), bem como servir como polímeros âncoras quando são explorados os grupos amino reativos livres à superfície polimérica.

De acordo com a Figura 2, a eletrossíntese da PTh realizada pela técnica de VC foi confirmada pelo aumento dos picos anódicos e catódicos em 0,2V e - 0,2V, respectivamente. Foi observado também um aumento na corrente de redução entre o potencial -0,4V e -0,5V, como indicativo da participação de ambos grupos amino

laterais dos monômeros de tionina envolvidos na formação da PTh. Uma das importantes variáveis que podem influenciar no comportamento eletroquímico de filmes eletrossintetizado é o meio em que são submetidos. Monômeros de tionina sintetizados em meios mais alcalinos resultam em polímeros menos condutores (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014). Owino e cols. (2008) obtiveram filmes de tionina de natureza multiporosa com alto rendimento quando a eletropolimerização foi realizada em pH 6,5 em tampão acetato (0,1M); a reação de polimerização procedeu-se a partir da oxidação dos grupos —NH_2 das moléculas de tionina em potencial abaixo 1,1V vs. Ag/AgCl (OWINO et al., 2008). Este alto rendimento pode ser atribuído ao alto pKa da tionina que se encontra em 11,3.

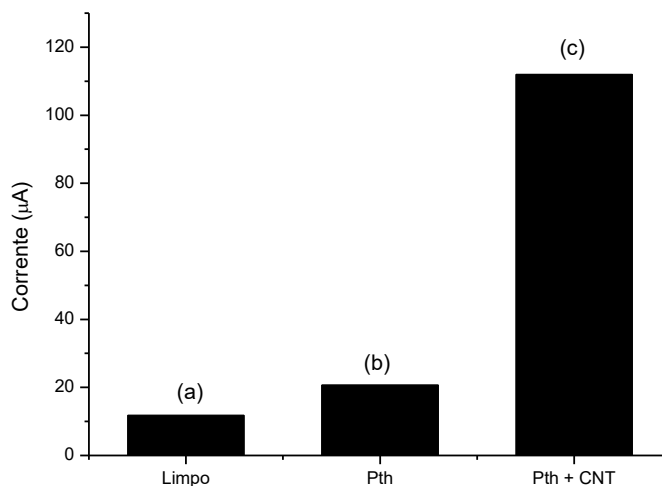
Figura 2. Voltamograma cíclico de eletrodo de EAU em processo de eletropolimerização para obtenção de PTh com 30 ciclos sucessivos na presença de eletrólito de suporte PBS (7,4).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Aqui, os filmes de PTh foram eletrossintetizados em tampão PBS (pH 7,4), resultando em um aumento da área eletroativa média de 75%, em relação ao eletrodo limpo (Figura 3), e com relativa disponibilidade de grupos amino reativos para a incorporação de nanotubos de carbono pela formação de ligações amidas com os grupos carboxílicos presentes em suas estruturas (Gomes et al., 2013).

Figura 3. Diagrama de barras indicando áreas eletroativas normalizadas em relação ao eletrodo limpo nos respectivos passos de montagem na presença de eletrólito suporte, 0,1M de KCl. (a) EAU limpo, (b) EAU/PTh (c) EAU/PTh/NTC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2. Montagem das nanoestruturas NTC@MB sobre filme de PTh

Sabe-se que a utilização de nanotubos carbono em plataformas sensoras melhoram a respostas analíticas, devido ao aumento de transferência eletrônica decorrente da presença de ligações sp^2 presentes em suas estruturas (PAMPALONI et al., 2019). Aqui, o incremento na condutividade advinda da adição do NTC à plataforma foi confirmado pelo expressivo aumento (aproximadamente 770 %) da área eletroativa em relação ao eletrodo com o filme de PTh, com base na equação de Randles-Sevick, equação 1 (SILVA et al., 2015):

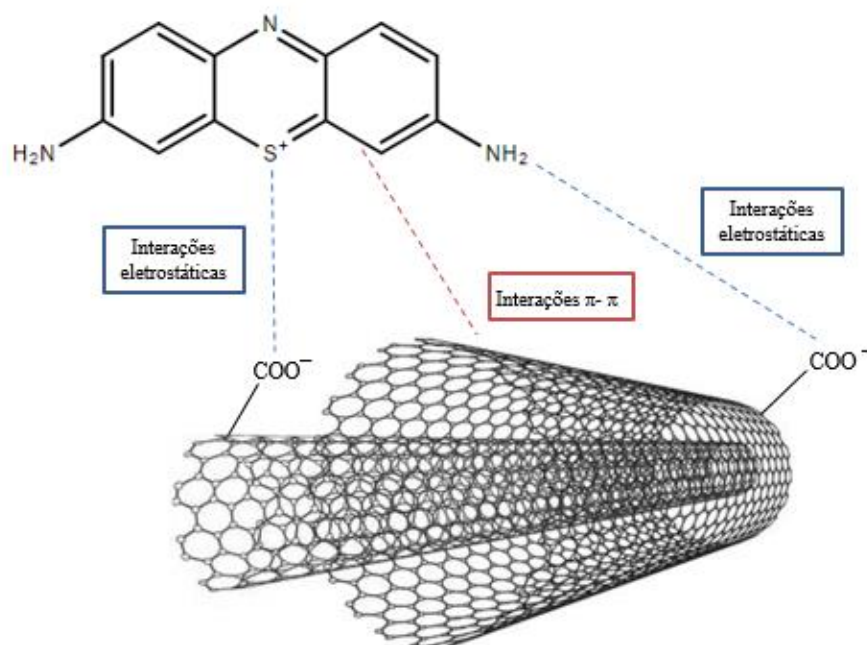
$$I_p = (2.69 \times 10^5) A D^{\frac{1}{2}} n^{\frac{3}{2}} V^{\frac{1}{2}} C \quad (\text{Equação 1})$$

onde, I_p é o valor da corrente de pico, A representa a área eletroativa do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão da solução em solução ($cm^2 s^{-1}$), n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, V é a taxa de varredura potencial ($V s^{-1}$) e C é a concentração da molécula sonda em solução (BARD et al., 2001).

O modo de ligação das nanoestruturas de carbono às superfícies sensoras podem afetar as respostas analíticas. As ligações covalentes são preferencialmente usadas (Gomes et al., 2013), entretanto ligações não covalentes por interações

eletrostáticas podem ser atrativas quando fortemente estabelecidas, tendo como vantagem a fácil implementação e redução de etapas (GHICA; FERREIRA; BRETT, 2015). Diferentes polímeros têm sido utilizados como âncoras para ligação de NTCs, dentre eles, os que apresentam em suas estruturas os grupos funcionais —COOH , —SH e —NH_2 (WANG et al., 2007)(DOHNO; STEMP; BARTON, 2003). Os polímeros com grupos —NH_2 de característica catiônica apresentam vantagens devido à fácil síntese de estruturas de carbono carboxiladas que garantem cargas opostas, facilitando tanto ligações covalentes quanto ligações por interações eletrostáticas. A tionina é uma pequena molécula planar com anel de fenotiazina com dois grupos aminos simetricamente distribuídos em cada lado, podendo interagir com os NTC de duas maneiras, ou covalentemente, ou não covalentemente (ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019). Aqui, acredita-se que os NTC se ligaram covalentemente ao filme de tionina por interações π - π que ocorrem com empilhamento dos anéis aromáticos presentes nas suas paredes laterais e anéis aromáticos fenotiazínicos da tionina, bem como por ligações não covalentes através de interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos com os átomos de enxofre presentes nas tioninas (WANG et al., 2007). Por outro lado, os grupos sulfônicos do PSS também atuaram na interação dos grupos amino da PTh facilitando uma outra interação eletrostática com os NTCs (GUIVER; ROBERTSON; FOLEY, 1995). Um desenho esquemático das prováveis ligações covalentes e não covalentes entre as estruturas fenotiazínicas e NTC são exibidas na Figura 4.

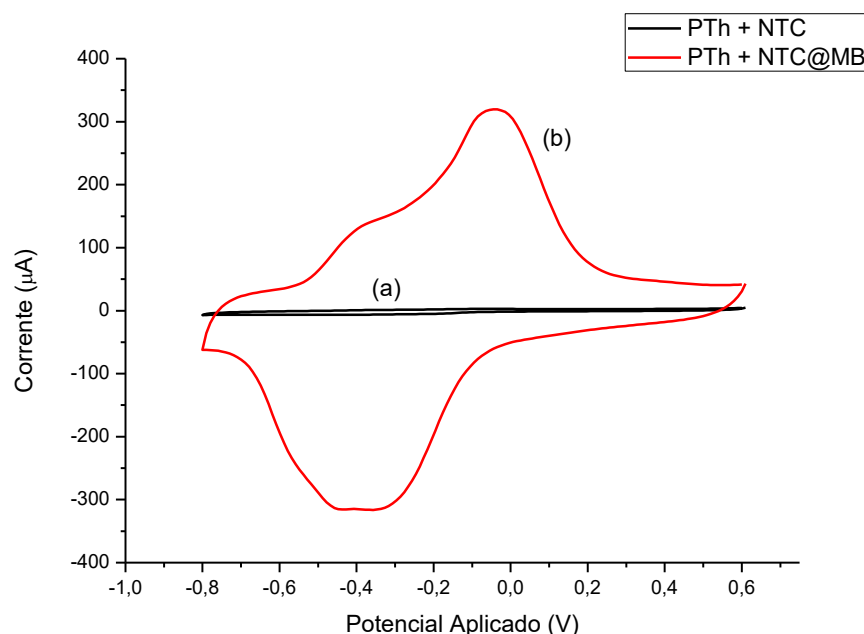
Figura 4: Representação dos processos de ligação que ocorrem no filme nanocompósito de PTh e NTC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma das vantagens do uso de nanoestruturas de carbono é sua facilidade de funcionalização com diferentes espécies químicas que podem promover maior transferência eletrônica aumentando a sensibilidade analítica de imunossensores. Aqui, o MB foi utilizado como mediador químico, devido sua estável propriedade eletrocromática e por apresentar Potencial Formal (E_0) relativamente baixo (entre 0.08 e -0.25 V) (YAO et al., 2005), impedindo reações de oxido-redução entre metabólitos sanguíneos. A presença do NTC@MB sobre o filme de PTh promoveu um aumento substancial na capacidade de armazenamento de cargas, compreendendo um incremento de cerca de 5000 vezes da área eletroativa quando comparada à área obtida com filme PTh/NTC. Além disso, a estável propriedade redox do corante fenotiazínico resultou no aparecimento de picos redox expressivos que foram confirmados pelos perfis voltamétricos realizados na presença de eletrólito suporte (0,1M KCl), com picos catódico em $-0,4\text{V}$ e anódico $-0,05\text{V}$ (Figura 5).

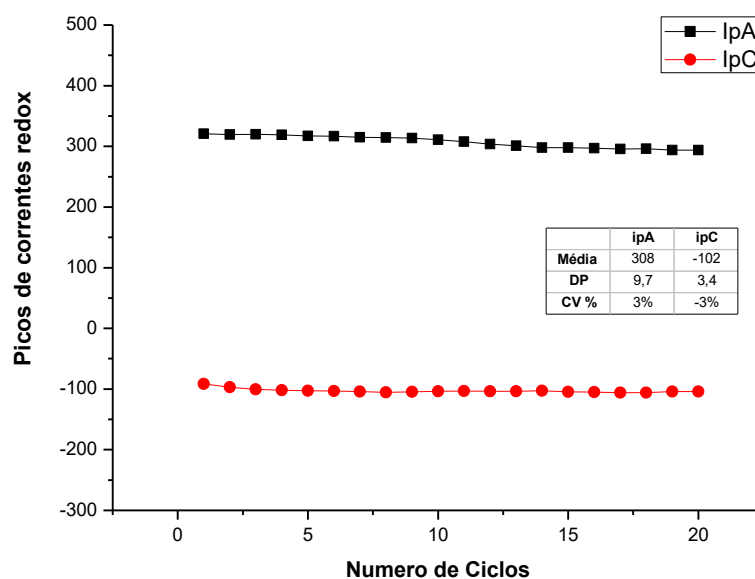
Figura 5. Típicos voltamogramas cíclicos realizados em EAu na presença de eletrólito suporte, 0,1M de KCl com velocidade de varredura de 30 mV/s. (a) EAu/PTH/NTC e (b) EAu/PTH/NTC@MB.



Fonte: Elaborado pelo autor

Estudos de estabilidade do nanofilme PTh/NTC@MB foram realizados submetendo-se os eletrodos a 20 ciclos consecutivos de voltametria cíclica ($v = 30\text{mV/s}$, janela de potencial entre -0,8 a 0,8V). Os coeficientes de variação (CVs) dos picos de correntes redox dos VCs foram calculados com o objetivo de avaliar sua estabilidade e reprodutibilidade operacional. Na Figura 6 observou-se a repetição de um padrão dos picos redox nas sucessivas medidas voltamétricas do eletrodo modificado, não existindo deslocamento significativo dos picos de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Os CVs calculados para I_{pa} e I_{pc} foram de aproximadamente 3% para ambos. Esta boa estabilidade alcançada pode ser atribuída às fortes ligações já descritas entre o filme de tionina e paredes laterais dos NTCs (ligações covalentes e interações eletrostáticas), bem como das ligações covalentes ocorridas entre os NTCs e o MB por intermédio do PSS. Acredita-se que os grupos sulfonas do PSS promoveram ligações π - π , ou seja uma ligação covalente entre as estruturas aromáticas presentes (ZHANG; XU, 2014).

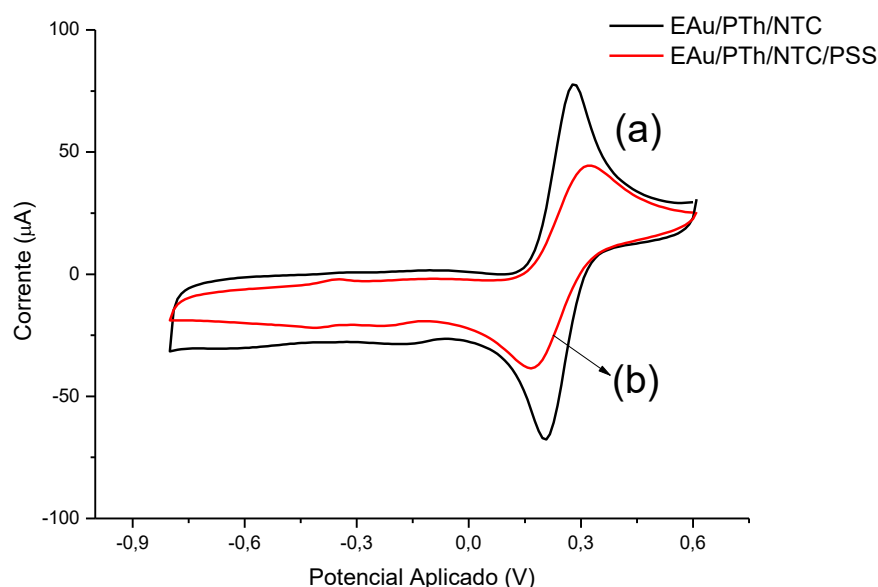
Figura 6: Estudo de estabilidade eletroquímica do filme, na presença de eletrólito de suporte, 0,1M de KCl. Respostas de I_{pA} e I_{pC} de CVs realizados em 20 ciclos sucessivos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Do ponto de vista eletroquímico, embora a introdução do PSS tenha facilitado uma melhor estabilidade na ligação entre NTC e MB, o PSS resultou em uma diminuição da área eletroativa do voltamograma de cerca de 40% (Figura 7), implicando redução na transferência eletrônica. Assim pode-se afirmar que o incremento de corrente faradaica, deve-se principalmente ao mediador MB (Figura 5).

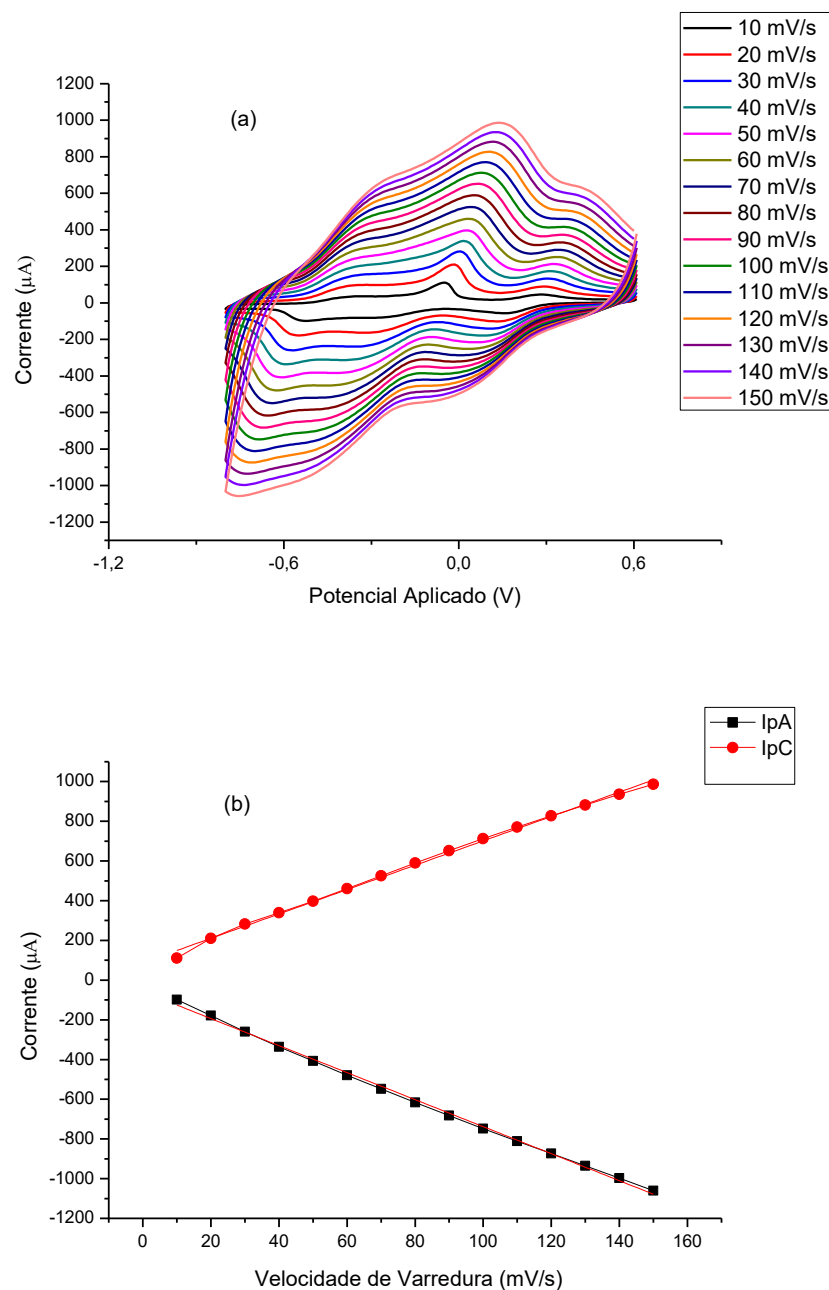
Figura 7: Perfis voltamétricos realizados em EAu na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$, em uma velocidade de varredura de 30 mV/s. (a) EAu/PTh/NTC e (b) EAu/PTh/NTC/PSS.



Fonte: Elaborado pelo autor

A ligação do MB à superfície nanoestrutura foi estudada por ensaios eletroquímicos submetendo-se o eletrodo modificado com filme de PTh/NTC@MB à diferentes velocidades de varredura em eletrólito suporte (Figura 8). Assim, quando realizada a análise dos picos da velocidade de varredura, observou-se aumento crescente dos picos redox. Foi observado uma curva de comportamento linear similarmente para de I_{pa} e I_{pc} com relação à velocidade de varredura ($r \cong 0,997$, $n=15$) comprovando que o mediador MB foi confinado à superfície do eletrodo com sucesso (YAO et al., 2005). Além disso, presumiu-se que o novo compósito redox (NTC@MB) apresentou comportamento eletroquímico de um processo quase-reversível ($slope I_{pa}/I_{pc} \leq 0,8$) (BARD et al., 2001).

Figura 8. (a) Perfis voltamétricos realizados em EAu/PTH/NTC@MB obtidos sob diferentes velocidades de varredura na presença de eletrólito suporte (PBS pH7,4). (b) Plot da velocidade de varredura vs. picos anódicos e catódicos.

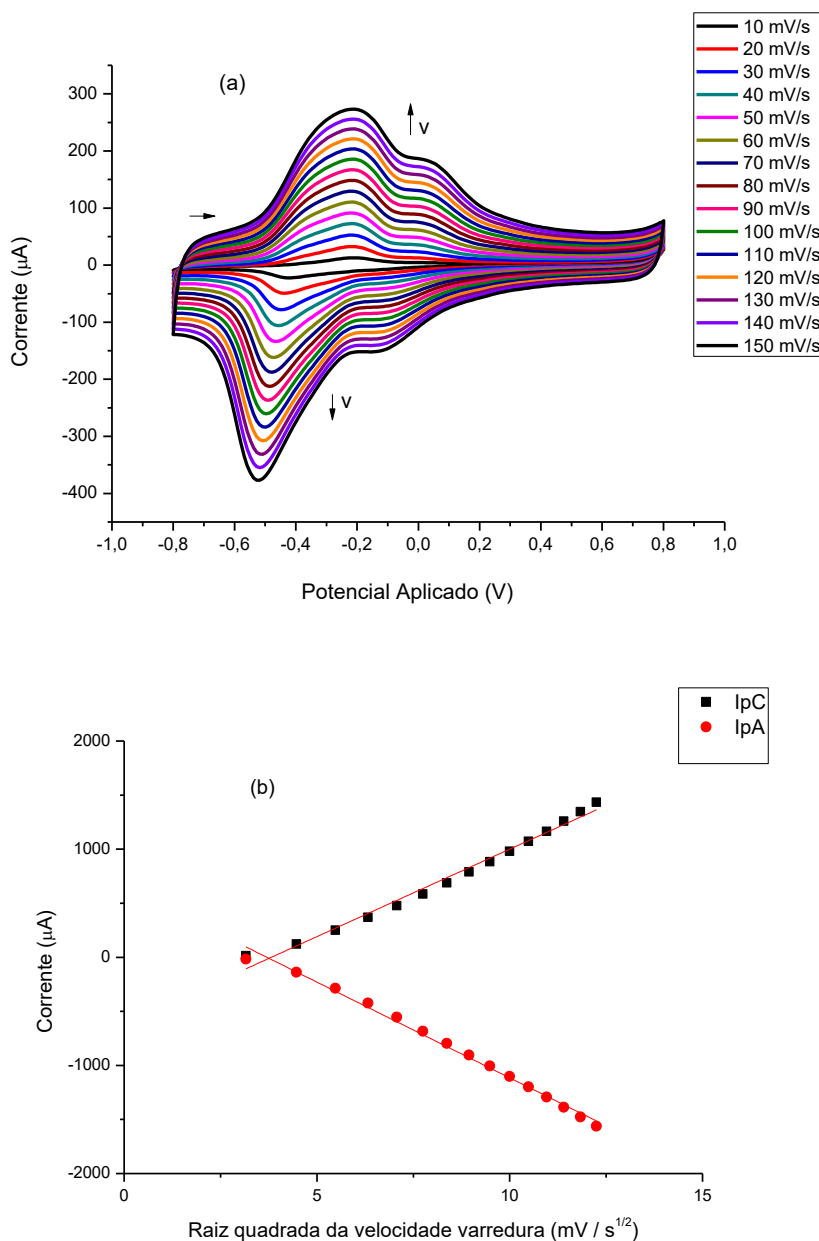


Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos de velocidade de varredura foram realizados com eletrodo modificado por nanocompósito EAu/PTH/NTC@MB na presença de sonda redox variando-se de 10 a 150 mV/s na presença de $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) / (\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$ à 0,005 M na janela potencial -0,8 a 0,8 V. Conforme o aumento da velocidade, foi observado um crescimento proporcional dos picos anódicos e catódicos (I_{pA} e I_{pC} , respectivamente) em relação à raiz quadrada de velocidade de varredura. (Figura 9

(b)) exibindo um r ajustado para $I_{pa} = 0,997$ e para $I_{pc} = 0,992$, sugerindo que as reações no eletrodo ocorreram com base em um comportamento controlado por difusão.

Figura 9: (a) Perfis voltamétricos realizados em EAu/PTh/NTC@MB obtidos sob diferentes velocidades de varredura na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$. (b) Plot da raiz quadrada da velocidade de varredura vs. picos anódicos e catódicos.

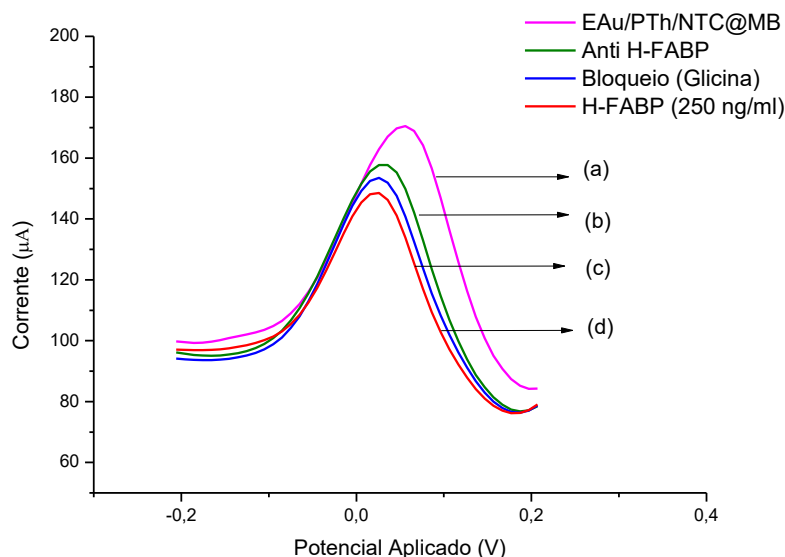


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Imobilização de Anticorpos

A imobilização de anticorpos Anti-H-FABP foi realizada considerando-se os grupamentos amino reativos presentes no agente bifuncional (EDA) que possibilitaram uma imobilização covalente com os sítios carboxilados tanto presentes na porção Fc dos anticorpos, quanto nos NTCs, gerando-se assim uma maior estabilidade para a plataforma. Para este procedimento, o terminal Fc dos anticorpos anti-H-FABP foi ativado previamente em meio levemente ácido por mistura [1:1] de EDC / NHS (20 mM e 50 mM, respectivamente) e EDA (20%). Uma redução nos picos do voltamograma indicam a presença dos Anti-H-FABP na plataforma sensora (Figura 10) (SILVA et al., 2016)(SILVA et al., 2015). A fim de bloquear as ligações não específicas, foi inserida uma etapa de bloqueio com glicina, também com redução dos picos de potencial (GOMES-FILHO et al., 2013).

Figura 10. Curvas representativas das etapas sucessivas de modificação da superfície sensora, obtido na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$, em uma velocidade de varredura de 30 mV/s. (a) EAu/PTh/NTC@MB, (b) EAu/PTh/NTC@MB/Anti-H-FABP, (c) EAu/PTh/NTC@MB/Anti-H-FABP/Glicina, (d) EAu/PTh/NTC@MB/Anti-H-FABP/Glicina/H-FABP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

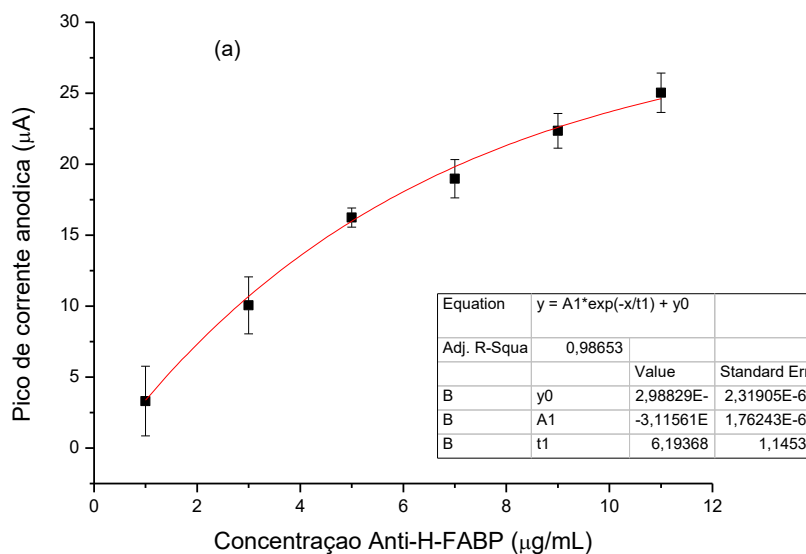
Para dar início aos estudos de simulação de modo a otimizar a concentração dos anticorpos usados no eletrodo anti-H-FABP foi realizado um estudo piloto de concentração em função das respostas de correntes anódicas (Figura 11 (a)). A partir da análise estatística, foi confirmado comportamento exponencial significativo

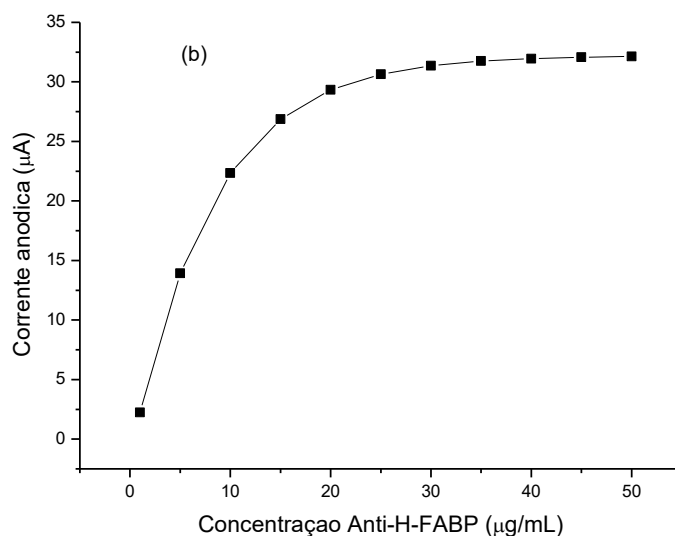
em função do aumento das concentrações de anticorpos imobilizados ($p < 0,05$, Teste qui-quadrado, $n = 6$). A concentração ótima de 20 $\mu\text{g/mL}$ de anti-H-FABP estabelecida pelo platô da curva (Figura 11 (b)), foi estimada em função da equação 2:

$$I_{pa} = I_0[\text{anti-H-FABP}] (\text{inicial}) + Ae^{-x/t_1} \quad (\text{Equação 2})$$

onde, I_{pa} representa a corrente de pico anódico; $I_0[\text{anti-H-FABP}]$ (inicial), a concentração de anticorpos de partida; A , é a componente dinâmica; x , a concentração de anticorpos no instante desejado, t_1 é a constante exponencial de crescimento da concentração de anticorpos anti-H-FABP.

Figura 11: (a) Curva de concentrações de anti-H-FABP (1; 3; 5; 7; 9; 11; $\mu\text{g/mL}$). (b) Curva de concentração simulada de H-FABP na presença de 5mM de $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) / (\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$, em uma velocidade de varredura de 30 mV/s.





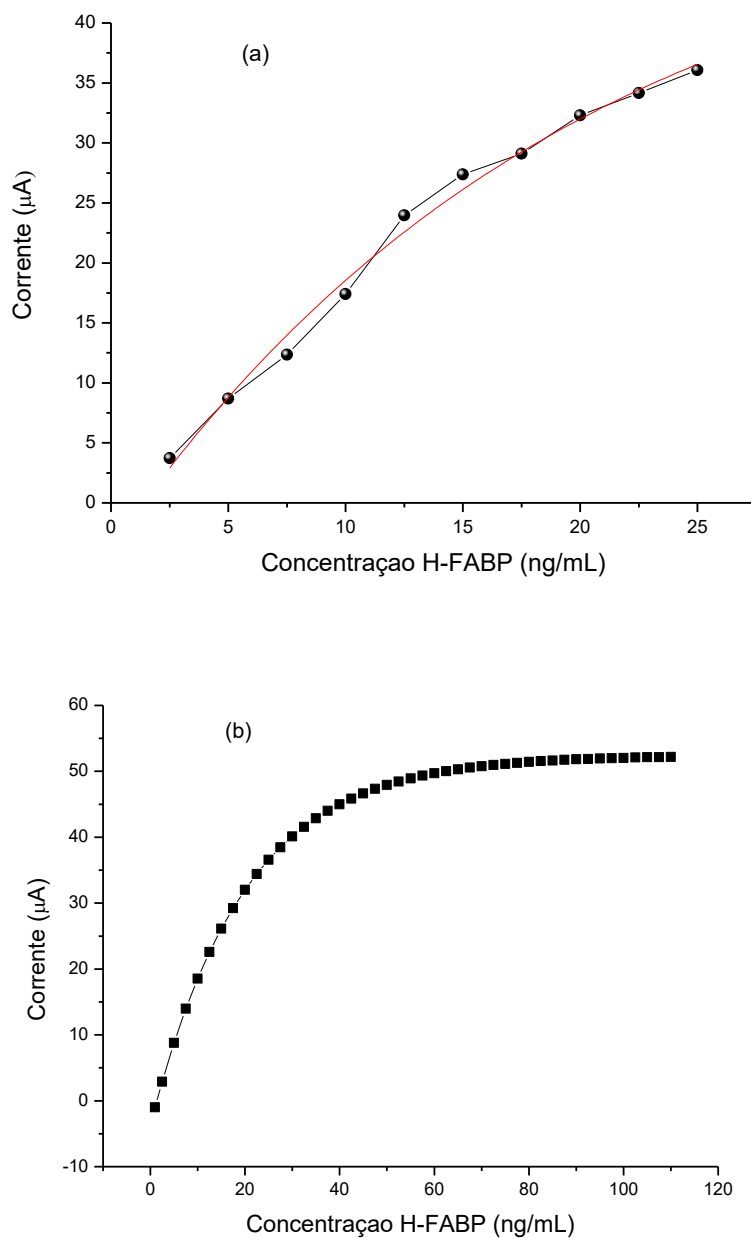
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Resposta analítica do H-FABP

Observou-se uma correlação linear crescente com o aumento das concentrações de H-FABP presentes nas amostras com o aumento de corrente de pico anódico. A curva de resposta em relação ao pico anódico do VC apresentou um comportamento eminentemente exponencial crescente ($p < 0,05$, Teste qui-quadrado, $n = 10$), apresentando função conforme ajuste matemático, equação 2 (Figura 12(a)).

Após estudos experimentais com base nas concentrações inseridas na fase linear da curva ajustada (Figura 12(a)), foi determinada uma faixa linear de resposta real do sensor, sendo estabelecida entre 2,5 a 25 ng/mL de H-FABP, superior aos testes de tira lateral que reconhecem os antígenos de proteína de ácidos graxos entre 7 a 10 ng/mL (BANU; TANVEER; MANJUNATH, 2015; CHAN et al., 2003; RAMAIAH et al., 2013). Além disso, o sistema apresentou uma boa sensibilidade analítica de $1,47 \mu\text{A.mL/ng}$ e coeficiente de variação aproximado de 6,1%, superior aos testes cromatográficos comerciais ($<10\%$) (BANK et al., 2016). O limite de detecção (LOD) foi calculado de acordo com a recomendação da IUPAC (IUPAC, 2009), sendo encontrado em $\text{LOD} = 3,0 \pm 1,5$, alcançando a faixa linear de resposta de importância para o diagnóstico clínico.

Figura 12: (a) Curva de calibração frente às diferentes concentrações de H-FABP (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,7; 20; 22,5; 25 ng/mL). (b) Ajuste linear da curva de concentração do antígeno. Medidas obtidas na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$, em uma velocidade de varredura de 30 mV/s.



Fonte: Elaborado pelo autor.

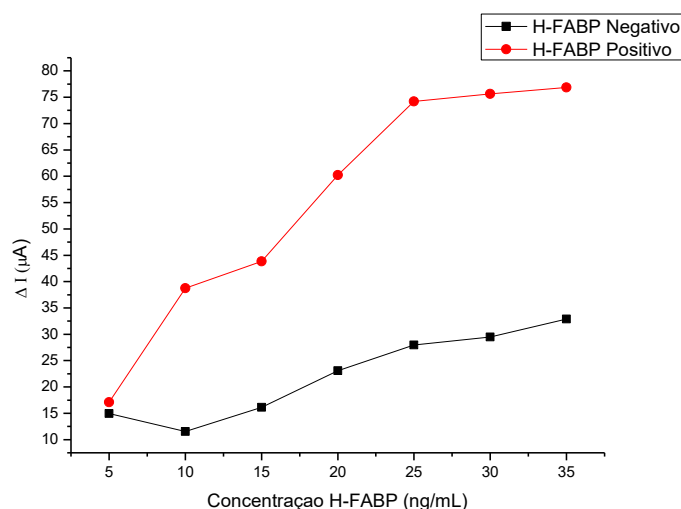
3.5 Estudo da resposta analítica em amostras de soro

Como prova de conceito para fins analíticos, foram realizados testes de sensibilidade diagnóstica com amostras de soro comerciais enriquecidas com o

antígeno H-FABP (Figura 13). O imunossensor exibiu uma faixa de resposta linear de 5 a 25 ng/mL e um limite de detecção (LOD) de 4,54 ng/mL H-FABP (IUPAC, 2009), também superior aos limites dos dispositivos de tira lateral (REDA; MOHARRAM; SOLIMAN, 2016).

Estudos de especificidade diagnóstica foram efetuados comparando-se amostras enriquecidas com amostras controles de soros comerciais padrões. Os resultados de respostas de correntes anódicas demonstraram um aumento linear com aumento da concentração, exibindo um coeficiente angular significativamente superior à aquele obtido de soros controles, com respostas de corrente anódica que praticamente permaneceram constantes em relação à linha de base (Figura 13). Nesse sentido, é possível afirmar que o imunossensor foi capaz de distinguir o H-FABP em soro positivo, a partir de 15 ng/mL, valor estabelecido para o Limite de Reação (*Cut-off*), calculado com base nos valores médios de resposta de corrente anódica dos VCs para o soro controle acrescidos de dois desvios padrões, intervalo de confiança entre 5 e 25 ng/mL H-FABP (IC = 95%). Foi possível afirmar que o imunossensor apresentou um alto poder de discriminação e efeitos à interferentes controlados, com a vantagem de não necessitar de um segundo anticorpo marcado para aumentar a especificidade diagnóstica, uma limitação que se faz necessária nos testes de imunoensaio enzimático para H-FABP (KIM et al., 2010).

Figura 13: Resposta linear do soro enriquecido e não enriquecido com o H-FABP na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$, em uma velocidade de varredura de 30 mV/s.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4 CONCLUSÕES

Uma plataforma sensora eletroquímica composta por um filme polimérico de politionina e nanomateriais conjugado a um mediador com características redox intrínsecas foi desenvolvido, indicando boas perspectivas para o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de anticorpos anti-H-FABP do tipo não marcado, e sem a necessidade de uso de solução adicional de sondas redox para as medidas amperométricas. Como prova de conceito, o imunossensor foi aplicado para a quantificação do H-FABP. Até a presente data, não existe imunossensor, nem biossensores para detecção do referido biomarcador. Os resultados analíticos de sensibilidade e especificidade diagnóstica obtidos de amostras de soro sanguíneo humano mostraram LOD e *Cut-off* em níveis de relevância desejáveis para a rotina clínica, na identificação precoce do IAM.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil, processo número 471065/2014-5 e 440506/2016-4.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, A. et al. Polypyrrole/carbon nanotube supercapacitors Technological advances and challenges. **Journal of Power Sources**, v. 352, p. 174–186, 2017.
- AGÜERO, F. et al. New myocardial infarction definition affects incidence, mortality, hospitalization rates and prognosis. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 22, n. 10, p. 1272–1280, 2015.
- ALEIXO, L. M. **Voltametria: conceitos e técnicas**, 2003. (Nota técnica).
- AMANI, J.; KHOSHROO, A.; RAHIMI-NASRABADI, M. Electrochemical immunosensor for the breast cancer marker CA 15–3 based on the catalytic activity of a CuS/reduced graphene oxide nanocomposite towards the electrooxidation of catechol. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 1, 2018.
- ASIF, M. et al. A review on electrochemical biosensing platform based on layered double hydroxides for small molecule biomarkers determination. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 262, p. 21–38, 2018.
- ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1853–1859, 2013.
- BAENA, C. P. et al. Tendência de Mortalidade por Infarto Agudo do Miocárdio em Curitiba (PR) no Período de 1998 a 2009. **Arq Bras Cardiol**, v. 98, n. 3, p. 211–217, 2012.
- BANK, I. E. et al. Suspected acute coronary syndrome in the emergency room: Limited added value of heart type fatty acid binding protein point of care or ELISA tests: The FAME-ER (Fatty Acid binding protein in Myocardial infarction Evaluation in the Emergency Room) study. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, v. 5, n. 4, p. 364–374, 2016.
- BANU, S.; TANVEER, S.; MANJUNATH, C. N. Comparative study of high sensitivity troponin T and heart-type fatty acid-binding protein in STEMI patients. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 56–61, 2015.
- BARD, A. J. et al. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. [s.l.: s.n.].
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; DE HEER, W. A. Carbon nanotubes - The route toward applications. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 787–792, 2002.
- BOUWMAN, M. L. B. B. Biomarcadores Cardíacos no Diagnóstico da Síndrome Coronária Aguda. 2014.
- BRETT, C.; BRETT, A. Electrochemistry: principles, methods, and applications. **Springer**, p. 427, 1993.
- BRIEGER, D. et al. Acute coronary syndromes without chest pain, an underdiagnosed and undertreated high-risk group: Insights from the global registry of

- acute coronary events. **Chest**, v. 126, n. 2, p. 461–469, 2004.
- CABRAL, M. F. et al. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Ecletica Química**, v. 28, n. 2, p. 41–47, 2003.
- CASTRO, R. V. O. Estudo do gene da proteína de ligação de ácidos graxos-coração (H-FABP) em suínos. p. 90, 2004.
- CAVALCANTE, P. et al. Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações . Electrochemical immunosensors. n. January, 2017.
- CAVUS, U. et al. Heart-type, fatty-acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. **Journal of the National Medical Association**, v. 98, n. 7, p. 1067–70, 2006.
- CHAGOVETS, V. V et al. Noncovalent Interaction of Methylene Blue with Carbon Nanotubes : Theoretical and Mass Spectrometry Characterization. 2012.
- CHAN, C. P. Y. et al. Development of a quantitative lateral-flow assay for rapid detection of fatty acid-binding protein. **Journal of Immunological Methods**, v. 279, n. 1–2, p. 91–100, 2003.
- CHAN, D.; NG, L. L. Biomarkers in acute myocardial infarction. **BMC Medicine**, v. 8, 2010.
- CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6–7, p. 441–456, 2002.
- CHMURZYŃSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 1, p. 39–48, 2006.
- COLLI, A. et al. Heart fatty acid binding protein in the diagnosis of myocardial infarction: Where do we stand today? **Cardiology**, v. 108, n. 1, p. 4–10, 2007.
- CORRÊA, R. A. M. S. et al. Optimization and Application of Electrochemical Transducer for Detection of Specific Oligonucleotide Sequence for Mycobacterium tuberculosis. **Biosensors**, v. 8, n. 3, 2018.
- CORREIA, L. C. L. et al. Valor prognóstico da troponina I de alta sensibilidade versus troponina T nas síndromes coronarianas agudas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 5, p. 406–412, 2012.
- DAS, U. N. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) and coronary heart disease. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 1, p. 16–18, 2016.
- DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- DISEASE, V.; SITUATIONS, S. Biomarkers in Cardiology - Part 2: In Coronary Heart Disease, Valve Disease and Special Situations. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 337–346, 2015.
- DOHNO, C.; STEMP, E. D. A.; BARTON, J. K. Fast back electron transfer prevents guanine damage by photoexcited thionine bound to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 32, p. 9586–9587, 2003.
- FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Advances in immunochemical technologies for analysis of organic pollutants in the environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1100–1112, 2007.
- FERAPONTOVA, E. E.; GOTHELF, K. V. Optimization of the electrochemical RNA-aptamer based biosensor for theophylline by using a methylene blue redox label. **Electroanalysis**, v. 21, n. 11, p. 1261–1266, 2009.
- FERREIRA MAGEE, R. et al. Síndrome Coronariana Aguda: uma revisão Acute Coronary Syndrome: a review. [s.d.].
- FERREIRA, V. C. T. Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na

- Concepção de Novas Arquiteturas contendo Nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatalise e Biosensores. 2011.
- FORD, E. ET AL. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980 - 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 2388–2398, 2007.
- GARZA, M. A. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 2, p. 52, 2015.
- GHICA, M. E.; FERREIRA, G. M.; BRETT, C. M. A. Poly(thionine)-carbon nanotube modified carbon film electrodes and application to the simultaneous determination of acetaminophen and dipyrone. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 9, p. 2869–2881, 2015.
- GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 874–881, 1999a.
- GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry | Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, 1999b.
- GODOY, M. F. DE; BRAILE, D. M.; PURINI NETO, J. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 4, p. 629–633, 1998.
- GOMES-FILHO, S. L. R. et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, v. 109, 2013.
- GOPINATH, S. C. B. et al. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302, 2014.
- GRACIA, R.; MECERREYES, D. Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 2206–2214, 2013.
- GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 96, n. 7, p. 48–50, 2008.
- GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8–9, p. 876–921, 2007.
- GUIVER, M. D.; ROBERTSON, G. P.; FOLEY, S. Chemical Modification of Polysulfones II: An Efficient Method for Introducing Primary Amine Groups onto the Aromatic Chain. **Macromolecules**, v. 28, n. 23, p. 7612–7621, 1995.
- GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 687–703, 2018.
- GURURAJAN, P. et al. Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP) as a Diagnostic Biomarker in Patients with Acute Coronary Syndrome. **Heart Lung and Circulation**, v. 19, n. 11, p. 660–664, 2010.
- GYÖRGY INZELT. Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry. In: **Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry**. [s.l: s.n.]. p. 282.
- HAJI-HASHEMI, H. et al. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 566, n. October 2018, p. 102–106, 2019.
- HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, V. et al. Infarto agudo miocárdico-embólico asociado a embolia pulmonar. **Revista Colombiana de Cardiologia**, v. 24, n. 4, p. 409.e1-409.e4, 2017.
- HOFFMANN, U. et al. Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015a.
- HOFFMANN, U. et al. Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein

- (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I. **BMC cardiovascular disorders**, v. 15, p. 50, jun. 2015b.
- IBANEZ, B. et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. **European Heart Journal**, v. 39, n. 2, p. 119–177, 2018.
- KAKOTI, A.; GOSWAMI, P. Heart type fatty acid binding protein: Structure, Function and biosensing applications for early detection of myocardial infarction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, n. 1, p. 400–411, 2013.
- KARUBE, I.; NOMURA, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 1–3, p. 177–181, 2000.
- KIM, Y. et al. Automated heart-type fatty acid-binding protein assay for the early diagnosis of acute myocardial infarction. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, n. 1, p. 157–162, 2010.
- KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 2016.
- KUMAR, A.; KUMAR, V.; AWASTHI, K. Polyaniline–Carbon Nanotube Composites: Preparation Methods, Properties, and Applications. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 57, n. 2, p. 70–97, 2018.
- LEE, J. O. et al. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 4, p. 1023–1032, 2008.
- LEVINE, G. N. et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for th. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 10, p. 1235–1250, 2016.
- LI, Y. et al. Chemical Engineering Research and Design Comparative study of methylene blue dye adsorption onto activated carbon , graphene oxide , and carbon nanotubes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 2, p. 361–368, 2012.
- LIBBY, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 21, p. 2004–2013, 2013.
- MANSUR, P. H. G. et al. Análise de Registros Eletrocardiográficos Associados ao Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivo**, v. 87, n. 2, p. 106–114, 2006.
- MCCANN, C. J. et al. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. **European Heart Journal**, v. 29, n. 23, p. 2843–2850, 2008.
- MCMAHON, C. G. et al. Diagnostic accuracy of heart-type fatty acid-binding protein for the early diagnosis of acute myocardial infarction. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 2, p. 267–274, 2012.
- MEHRVAR, M. et al. Fiber-Optic Biosensors. Trends and Advances. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 7, p. 677–692, 2000.
- MIRANDA, M. R. DE; LIMA, L. M. Biochemical markers of acute myocardial infarction. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 95–102, 2014.
- MIRANDA, G. C. D. E. Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador de Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador . 2014.
- MIRANDA SILVA, I.; GONTIJO DA SILVA, M. Infarto Agudo Do Miocardio:

- Assistência Ao Paciente Pã“S-Infarto Internado Em Unidade De Terapia Intensiva. **Amazônia Science & Health**, v. 6, n. 1, p. 12–21, 2018.
- MISTRY, K. K. et al. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2289–2311, 2014.
- MOREIRA, F. T. C. et al. Redox probe-free readings of a B-amyloid-42 plastic antibody sensory material assembled on copper@carbon nanotubes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 264, p. 1–9, 2018.
- MORRONE, D.; MORONE, V. Acute pulmonary embolism: Focus on the clinical picture. **Korean Circulation Journal**, v. 48, n. 5, p. 365–381, 2018.
- NIČ, M. et al. (EDS.). **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- NICOLAU, J. C.; ET AL. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST (II Edição, 2007) – Atualização 2013/2014. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, p. 1–61, 2014.
- OLIVEIRA, V. et al. Nanotubos de carbono aplicados às neurociências: perspectivas e desafios Carbon nanotubes applied in neuroscience: prospects and challenges. v. 38, n. 5, p. 201–206, 2011.
- OTAKI, Y.; WATANABE, T.; KUBOTA, I. Heart-type fatty acid-binding protein in cardiovascular disease: A systemic review. **Clinica Chimica Acta**, v. 474, n. September, p. 44–53, 2017.
- OWINO, J. H. O. et al. Electrochemical Immunosensor Based on Polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B 1. **Sensors**, v. 8, p. 8262–8274, 2008.
- PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- PAMPALONI, N. P. et al. Advances in Nano Neuroscience: From Nanomaterials to Nanotools. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–16, 2019.
- PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1349–1354, 2003.
- PESARO, A. E. P.; SERRANO JR., C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 214–220, 2004.
- PUMERA, M. Electrochemical properties of double wall carbon nanotube electrodes. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, n. 2, p. 87–93, 2007.
- RAMAIAH, J. H. et al. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-Fabp) As a Novel Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction in Comparison With Cardiac Troponin T. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 8–18, 2013.
- RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403–2412, 2010.
- REDA, A.; MOHARRAM, M.; SOLIMAN, M. Role of heart fatty acid-binding protein (h-FABP-type III) as a diagnostic biomarker in acute coronary syndrome. **Menoufia Medical Journal**, v. 29, n. 1, p. 73, 2016.
- REGAN, B.; O’KENNEDY, R.; COLLINS, D. Point-of-Care Compatibility of Ultra-Sensitive Detection Techniques for the Cardiac Biomarker Troponin I—Challenges and Potential Value. **Biosensors**, v. 8, n. 4, p. 114, 2018.
- RESENDE, L. O. et al. BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA C

- REATIVA EM CARDIOPATIAS. p. 2421–2424, 2015.
- RIBEIRO, A. L. P. et al. Cardiovascular Health in Brazil. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. 422–433, 2016.
- RITA, A. et al. Eletrocardiograma no Infarto Agudo do Miocárdio : O que Esperar ? v. 29, n. 3, p. 198–209, 2016.
- ROFFI, M. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. **European Heart Journal**, v. 37, n. 3, p. 267–315, 2016.
- RUFF, C. T.; BRAUNWALD, E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, n. 3, p. 140–147, 2011.
- SÁNCHEZ-MORENO, P. et al. Thermo-Sensitive Nanomaterials: Recent Advance in Synthesis and Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 11, p. 935, 2018.
- SANG, S. et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 465–481, 2016.
- SANTOS, J. DOS et al. Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil e suas regiões geográficas: análise do efeito da idade-período-coorte. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 5, p. 1621–1634, 2018.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.
- SBC- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. **Dados**, [s.d.].
- SILVA, B. V. M. et al. An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 978–985, 2016.
- SILVA JÚNIOR, A. A. DA. Imunossensor baseado em grafeno-polissulfona para detecção da artrite reumatoide: anti-peptídeo citrulinado. 2010.
- SILVA, M. M. S. et al. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, v. 128, p. 505–510, out. 2014.
- SILVA, M. M. S. et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 194–200, 2015.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: [s.n.].
- SOLER, M.; HUERTAS, C. S.; LECHUGA, L. M. Label-free plasmonic biosensors for point-of-care diagnostics: a review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2018.
- SYAHIR, A. et al. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. **Microarrays**, v. 4, n. 2, p. 228–244, 2015.
- SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: The impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 373–387, 2017.
- TANG, J. L. et al. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 119, n. 1, p. 105–109, 2006.
- TELES, F. S. R. R. Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluidos biológicos. 2006.
- THYGESEN, K. et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. **European Heart Journal**, v. 31, n. 18, p. 2197–2204, 2010.
- THYGESEN, K. et al. Third universal definition of myocardial infarction. **European**

- Heart Journal**, v. 33, n. 20, p. 2551–2567, 2012.
- TÎLMACIU, C.-M.; MORRIS, M. C. Carbon nanotube biosensors. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 59, 2015.
- TOMIZAKI, K. Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-protein interactions and selection: Array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. **FEBS Journal**, v. 277, n. 9, p. 1996–2005, 2010.
- TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, p. 1–9, 2014.
- WAN, Y. et al. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 1–11, 2013.
- WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Second Edi ed. [s.l: s.n.].
- WANG, Z. et al. Thionine-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticle composites. **Carbon**, v. 45, n. 10, p. 2111–2115, 2007.
- WHO. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2018.
- WILSON, G. S.; GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2388–2403, 2005.
- XU, Y. et al. Enhancement of electrochemical capacitance of carbon nanotubes by polythionine modification. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 417–421, 2010.
- YAMANAKA, K.; VESTERGAARD, M. C.; TAMIYA, E. Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, n. 10, p. 1–16, 2016.
- YAN, Y. et al. Adsorption of Methylene Blue Dye onto Carbon Nanotubes : A Route to an Electrochemically Functional Nanostructure and Its Layer-by-Layer Assembled Nanocomposite. n. d, p. 3457–3463, 2005.
- YANG, W. et al. Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes. p. 1299–1302, 2002.
- YAO, H. et al. Electrochemical study of a new methylene blue/silicon oxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 2, p. 372–377, 2005.
- YOO, E. H.; LEE, S. Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4558–4576, 2010.
- ZANATO, N. Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de troponina cardíaca utilizando nanopartículas de ouro e nanoplaquetas de grafite. 2016.
- ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo vadis? **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1533–1539, 2013.
- ZHANG, Z.; XU, X. Wrapping carbon nanotubes with poly (sodium 4-styrenesulfonate) for enhanced adsorption of methylene blue and its mechanism. **CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL**, v. 256, p. 85–92, 2014.
- ZHOU, Y.; FANG, Y.; RAMASAMY, R. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. **Sensors**, v. 19, n. 2, p. 392, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Um imunossensor eletroquímico com sensibilidade e especificidade diagnóstica suficientes para detecção do H-FABP em níveis de significância clínica foi alcançado;
- O estudo com o mediador fenotiazínico (MB) conjugado ao NTC mostrou-se eficaz na resposta amperométrica por aumentar a capacidade de armazenamento de carga, bem como amplificação das correntes faradaicas, e
- A estabilidade de ligação alcançada entre o PTh e NTC, deveu-se às suas estruturas químicas ricas em anéis aromáticos, favorecendo principalmente às ligações covalentes π - π e interações eletrostáticas. Além disso, a ligação estável dessas estruturas resultou num efeito sinérgico com aumento de cerca de 8 vezes maior da área eletroativa em relação ao filme isolado de PTh.

Como perspectivas e desdobramento deste trabalho, pretende-se ampliar os números de testes e provas analíticas com amostras reais, incluindo soro e sangue de pacientes infartados e controles, assim como desenvolver um protótipo portátil do tipo *point-of-care*. Novos estudos de caracterização morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho pela transformada de Fourier (*FTIR*) poderão consolidar os pressupostos teorizados.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, A. et al. Polypyrrole/carbon nanotube supercapacitors Technological advances and challenges. **Journal of Power Sources**, [S. l.], v. 352, p. 174–186, 2017.
- AGÜERO, F. et al. New myocardial infarction definition affects incidence, mortality, hospitalization rates and prognosis. **European Journal of Preventive Cardiology**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 1272–1280, 2015.
- ALEIXO, L. M. **Voltametria: conceitos e técnicas**, 2003. (Nota técnica), [S. l.].
- AMANI, J.; KHOSHROO, A.; RAHIMI-NASRABADI, M. Electrochemical immunosensor for the breast cancer marker CA 15–3 based on the catalytic activity of a CuS/reduced graphene oxide nanocomposite towards the electrooxidation of catechol. **Microchimica Acta**, [S. l.], v. 185, n. 1, 2018.
- ASIF, M. et al. A review on electrochemical biosensing platform based on layered double hydroxides for small molecule biomarkers determination. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 262, p. 21–38, 2018.
- ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science & Engineering C**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 1853–1859, 2013.
- BAENA, C. P. et al. Tendência de Mortalidade por Infarto Agudo do Miocárdio em Curitiba (PR) no Período de 1998 a 2009. **Arq Bras Cardiol**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 211–217, 2012.
- BANK, I. E. et al. Suspected acute coronary syndrome in the emergency room: Limited added value of heart type fatty acid binding protein point of care or ELISA tests: The FAME-ER (Fatty Acid binding protein in Myocardial infarction Evaluation in the Emergency Room) study. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 364–374, 2016.
- BANU, S.; TANVEER, S.; MANJUNATH, C. N. Comparative study of high sensitivity troponin T and heart-type fatty acid-binding protein in STEMI patients. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 56–61, 2015.
- BARD, A. J. et al. **Electrochemical methods Fundamentals and Applications**, [S. l.].
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; DE HEER, W. A. Carbon nanotubes - The route toward applications. **Science**, [S. l.], v. 297, n. 5582, p. 787–792, 2002.
- BOUWMAN, M. L. B. B. **Biomarcadores Cardíacos no Diagnóstico da Síndrome Coronária Aguda**, [S. l.], 2014.
- BRETT, C.; BRETT, A. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**.

Springer, [S. l.], p. 427, 1993.

BRIEGER, D. et al. Acute coronary syndromes without chest pain, an underdiagnosed and undertreated high-risk group: Insights from the global registry of acute coronary events. **Chest**, [S. l.], v. 126, n. 2, p. 461–469, 2004.

CABRAL, M. F. et al. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Ecletica Química**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 41–47, 2003.

CASTRO, R. V. O. **Estudo do gene da proteína de ligação de ácidos graxos-coração (H-FABP) em suínos**, [S. l.], p. 90, 2004.

CAVALCANTE, P. et al. **Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações . Electrochemical immunosensors**, [S. l.], January, 2017.

CAVUS, U. et al. Heart-type, fatty-acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. **Journal of the National Medical Association**, [S. l.], v. 98, n. 7, p. 1067–70, 2006.

CHAGOVETS, V. V et al. **Noncovalent Interaction of Methylene Blue with Carbon Nanotubes**: Theoretical and Mass Spectrometry Characterization, [S. l.], 2012.

CHAN, C. P. Y. et al. Development of a quantitative lateral-flow assay for rapid detection of fatty acid-binding protein. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 279, n. 1–2, p. 91–100, 2003.

CHAN, D.; NG, L. L. Biomarkers in acute myocardial infarction. **BMC Medicine**, [S. l.], v. 8, 2010.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 17, n. 6–7, p. 441–456, 2002.

CHMURZYŃSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 39–48, 2006.

COLLI, A. et al. Heart fatty acid binding protein in the diagnosis of myocardial infarction: Where do we stand today? **Cardiology**, [S. l.], v. 108, n. 1, p. 4–10, 2007.

CORRÊA, R. A. M. S. et al. Optimization and Application of Electrochemical Transducer for Detection of Specific Oligonucleotide Sequence for Mycobacterium tuberculosis. **Biosensors**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2018.

CORREIA, L. C. L. et al. Valor prognóstico da troponina I de alta sensibilidade versus troponina T nas síndromes coronarianas agudas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 98, n. 5, p. 406–412, 2012.

DAS, U. N. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) and coronary heart disease. **Indian Heart Journal**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 16–18, 2016.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DISEASE, V.; SITUATIONS, S. Biomarkers in Cardiology - Part 2: In Coronary Heart Disease, Valve Disease and Special Situations. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], p. 337–346, 2015.

DOHNO, C.; STEMP, E. D. A.; BARTON, J. K. Fast back electron transfer prevents guanine damage by photoexcited thionine bound to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 125, n. 32, p. 9586–9587, 2003.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Advances in immunochemical technologies for analysis of organic pollutants in the environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 1100–1112, 2007.

FERAPONTOVA, E. E.; GOTHELF, K. V. Optimization of the electrochemical RNA-aptamer based biosensor for theophylline by using a methylene blue redox label. **Electroanalysis**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 1261–1266, 2009.

FERREIRA MAGEE, R. et al. **Síndrome Coronariana Aguda: uma revisão** Acute Coronary Syndrome: a review, [S. l.], 2012.

FERREIRA, V. C. T. **Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Concepção de Novas Arquiteturas contendo Nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatalise e Biosensores**, [S. l.], 2011.

FORD, E. ET AL. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980 - 2000. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 356, p. 2388–2398, 2007.

GARZA, M. A. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction. **World Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 52, 2015.

GHICA, M. E.; FERREIRA, G. M.; BRETT, C. M. A. Poly(thionine)-carbon nanotube modified carbon film electrodes and application to the simultaneous determination of acetaminophen and dipyrone. **Journal of Solid State Electrochemistry**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 2869–2881, 2015.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 874–881, 1999a.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry | Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, [S. l.], v. 22, n. 6, 1999b.

GODOY, M. F. DE; BRAILE, D. M.; PURINI NETO, J. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 629–633, 1998.

GOMES-FILHO, S. L. R. et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 109, 2013.

GOPINATH, S. C. B. et al. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 57, p. 292–302, 2014.

GRACIA, R.; MECERREYES, D. Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 2206–2214, 2013.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, [S. l.], v. 96, n. 7, p. 48–50, 2008.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [S. l.], v. 32, n. 8–9, p. 876–921, 2007.

GUIVER, M. D.; ROBERTSON, G. P.; FOLEY, S. Chemical Modification of Polysulfones II: An Efficient Method for Introducing Primary Amine Groups onto the Aromatic Chain. **Macromolecules**, [S. l.], v. 28, n. 23, p. 7612–7621, 1995.

GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 108, p. 687–703, 2018.

GURURAJAN, P. et al. Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP) as a Diagnostic Biomarker in Patients with Acute Coronary Syndrome. **Heart Lung and Circulation**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 660–664, 2010.

GYÖRGY INZELT. Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry. In: **Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry**, [S. l.], p. 282, 2012.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 566, n. October 2018, p. 102–106, 2019.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, V. et al. Infarto agudo miocárdico-embólico asociado a embolia pulmonar. **Revista Colombiana de Cardiología**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 409.e1-409.e4, 2017.

HOFFMANN, U. et al. Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I. **BMC Cardiovascular Disorders**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015a.

HOFFMANN, U. et al. Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I. **BMC cardiovascular disorders**, [S. l.], v. 15, p. 50, jun. 2015b.

IBANEZ, B. et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 119–177, 2018.

KAKOTI, A.; GOSWAMI, P. Heart type fatty acid binding protein: Structure, Function and biosensing applications for early detection of myocardial infarction. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 400–411, 2013.

KARUBE, I.; NOMURA, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, [S. l.], v. 10, n. 1–3, p. 177–181, 2000.

KIM, Y. et al. Automated heart-type fatty acid-binding protein assay for the early diagnosis of acute myocardial infarction. **American Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 134, n. 1, p. 157–162, 2010.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 79, p. 88–105, 2016.

KUMAR, A.; KUMAR, V.; AWASTHI, K. Polyaniline–Carbon Nanotube Composites: Preparation Methods, Properties, and Applications. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 70–97, 2018.

LEE, J. O. et al. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 390, n. 4, p. 1023–1032, 2008.

LEVINE, G. N. et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for th. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 67, n. 10, p. 1235–1250, 2016.

LI, Y. et al. Chemical Engineering Research and Design Comparative study of methylene blue dye adsorption onto activated carbon , graphene oxide , and carbon nanotubes. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 361–368, 2012.

LIBBY, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 368, n. 21, p. 2004–2013, 2013.

MANSUR, P. H. G. et al. Análise de Registros Eletrocardiográficos Associados ao Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivo**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 106–114, 2006.

MCCANN, C. J. et al. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 29, n. 23, p. 2843–2850, 2008.

MCMAHON, C. G. et al. Diagnostic accuracy of heart-type fatty acid-binding protein

for the early diagnosis of acute myocardial infarction. **American Journal of Emergency Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 267–274, 2012.

MEHRVAR, M. et al. Fiber-Optic Biosensors. Trends and Advances. **Analytical Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 677–692, 2000.

MIRANDA, M. R. DE; LIMA, L. M. Biochemical markers of acute myocardial infarction. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 95–102, 2014.

MIRANDA, G. C. D. E. **Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador** [S. l.], 2014.

MIRANDA SILVA, I.; GONTIJO DA SILVA, M. Infarto Agudo Do Miocardio: Assitãšncia Ao Paciente Pã“S-Infarto Internado Em Unidade De Terapia Intensiva. **Amazônia Science & Health**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 12–21, 2018.

MISTRY, K. K. et al. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **Analyst**, [S. l.], v. 139, n. 10, p. 2289–2311, 2014.

MOREIRA, F. T. C. et al. Redox probe-free readings of a B-amyloid-42 plastic antibody sensory material assembled on copper@carbon nanotubes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 264, p. 1–9, 2018.

MORRONE, D.; MORONE, V. Acute pulmonary embolism: Focus on the clinical picture. **Korean Circulation Journal**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 365–381, 2018.

NIČ, M. et al. (EDS.). **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triagle Park, NC: IUPAC, 2009.

NICOLAU, J. C.; ET AL. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST (II Edição, 2007) – Atualização 2013/2014. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 102, p. 1–61, 2014.

OLIVEIRA, V. et al. **Nanotubos de carbono aplicados às neurociências: perspectivas e desafios**. Carbon nanotubes applied in neuroscience: prospects and challenges, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 201–206, 2011.

OTAKI, Y.; WATANABE, T.; KUBOTA, I. Heart-type fatty acid-binding protein in cardiovascular disease: A systemic review. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 474, n. September, p. 44–53, 2017.

OWINO, J. H. O. et al. Electrochemical Immunosensor Based on Polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B 1. **Sensors**, [S. l.], v. 8, p. 8262–8274, 2008.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAMPALONI, N. P. et al. Advances in Nano Neuroscience: From Nanomaterials to

Nanotools. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. January, p. 1–16, 2019.

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

PESARO, A. E. P.; SERRANO JR., C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 214–220, 2004.

PUMERA, M. Electrochemical properties of double wall carbon nanotube electrodes. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 87–93, 2007.

RAMAIAH, J. H. et al. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-Fabp) As a Novel Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction in Comparison With Cardiac Troponin T. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 8–18, 2013.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 398, n. 6, p. 2403–2412, 2010.

REDA, A.; MOHARRAM, M.; SOLIMAN, M. Role of heart fatty acid-binding protein (h-FABP-type III) as a diagnostic biomarker in acute coronary syndrome. **Menoufia Medical Journal**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 73, 2016.

REGAN, B.; O'KENNEDY, R.; COLLINS, D. Point-of-Care Compatibility of Ultra-Sensitive Detection Techniques for the Cardiac Biomarker Troponin I—Challenges and Potential Value. **Biosensors**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 114, 2018.

RESENDE, L. O. et al. **Biossensor para detecção de proteína c reativa em cardiopatias**, [S. l.], p. 2421–2424, 2015.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Cardiovascular Health in Brazil. **Circulation**, [S. l.], v. 133, n. 4, p. 422–433, 2016.

RITA, A. et al. Eletrocardiograma no Infarto Agudo do Miocárdio : O que Esperar ?[S. l.], v. 29, n. 3, p. 198–209, 2016.

ROFFI, M. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 267–315, 2016.

RUFF, C. T.; BRAUNWALD, E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. **Nature Reviews Cardiology**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 140–147, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, P. et al. Thermo-Sensitive Nanomaterials: Recent Advance in Synthesis and Biomedical Applications. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 935, 2018.

SANG, S. et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 465–481, 2016.

SANTOS, J. DOS et al. Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil e suas regiões geográficas: análise do efeito da idade-período-coorte. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1621–1634, 2018.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SBC- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. [S. l.], 2018.

SILVA, B. V. M. et al. An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 77, p. 978–985, 2016.

SILVA JÚNIOR, A. A. DA. Imunossensor baseado em grafeno-polissulfona para detecção da artrite reumatoide: antipeptídeo citrulinado, [S. l.], 2010.

SILVA, M. M. S. et al. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, [S. l.], v. 128, p. 505–510, out. 2014.

SILVA, M. M. S. et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 194–200, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 5. ed. Porto Alegre: [s.n.].

SOLER, M.; HUERTAS, C. S.; LECHUGA, L. M. Label-free plasmonic biosensors for point-of-care diagnostics: a review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–11, 2018.

SYAHIR, A. et al. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. **Microarrays**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 228–244, 2015.

SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: The impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 87, p. 373–387, 2017.

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

TELES, F. S. R. R. Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluidos biológicos, [S. l.], 2006.

THYGESEN, K. et al. Recommendations for the use of cardiac troponin

measurement in acute cardiac care. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 31, n. 18, p. 2197–2204, 2010.

THYGESEN, K. et al. Third universal definition of myocardial infarction. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 33, n. 20, p. 2551–2567, 2012.

TÎLMACIU, C.-M.; MORRIS, M. C. Carbon nanotube biosensors. **Frontiers in chemistry**, [S. l.], v. 3, p. 59, 2015.

TOMIZAKI, K. Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-protein interactions and selection: Array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 277, n. 9, p. 1996–2005, 2010.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 131, n. 1, p. 1–9, 2014.

WAN, Y. et al. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 47, p. 1–11, 2013.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Second Edi ed. [s.l: s.n.].

WANG, Z. et al. Thionine-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticle composites. **Carbon**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 2111–2115, 2007.

WHO. **The top 10 causes of death**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>., [S. l.].

WILSON, G. S.; GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 2388–2403, 2005.

XU, Y. et al. Enhancement of electrochemical capacitance of carbon nanotubes by polythionine modification. **Chinese Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 417–421, 2010.

YAMANAKA, K.; VESTERGAARD, M. C.; TAMIYA, E. Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. **Sensors (Switzerland)**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 1–16, 2016.

YAN, Y. et al. Adsorption of Methylene Blue Dye onto Carbon Nanotubes : A Route to an Electrochemically Functional Nanostructure and Its Layer-by-Layer Assembled Nanocomposite, [S. l.], p. 3457–3463, 2005.

YANG, W. et al. Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes. p. 1299–1302, 2002.

YAO, H. et al. Electrochemical study of a new methylene blue/silicon oxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 372–377, 2005.

YOO, E. H.; LEE, S. Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. **Sensors**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 4558–4576, 2010.

ZANATO, N. Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de troponina cardíaca utilizando nanopartículas de ouro e nanoplaquetas de grafite, [S. l.], 2016.

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo vadis? **Quimica Nova**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1533–1539, 2013.

ZHANG, Z.; XU, X. Wrapping carbon nanotubes with poly (sodium 4-styrenesulfonate) for enhanced adsorption of methylene blue and its mechanism. **CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL**, [S. l.], v. 256, p. 85–92, 2014.

ZHOU, Y.; FANG, Y.; RAMASAMY, R. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. **Sensors**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 392, 2019.