



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

LIANDRA ROBERTA PINHO DA CUNHA COUTINHO

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE NANOHÍBRIDO POLIMÉRICO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP, UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO**

Recife

2020

LIANDRA ROBERTA PINHO DA CUNHA COUTINHO

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE NANOHÍBRIDO POLIMÉRICO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP, UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO**

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.

Área de concentração: Bioengenharia.

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

Recife

2020

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

C871i Coutinho, Liandra Roberta Pinho da Cunha.
Imunossensor eletroquímico de nanohíbrido polimérico para detecção do H-FABP, um marcador precoce do infarto agudo do miocárdio / Liandra Roberta Pinho da Cunha Coutinho - 2020.
75 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, 2020.
Inclui Referências.

1. Engenharia Biomédica. 2. Imunossensor. 3. Nanotubos de carbono. 4. H-FABP. 5. Infarto agudo do miocárdio. I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orientadora). II. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2020-113

LIANDRA ROBERTA PINHO DA CUNHA COUTINHO

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE NANOHÍBRIDO POLIMÉRICO PARA
DETECÇÃO DO H-FABP, UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO**

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: 10 / 03 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Blanca Azuncena Gómez Rodríguez (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Erika Ketlem Gomes Trindade (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Washington e Sandra e irmão Wastinho por toda dedicação, incentivo e carinho. À Jean por todo companheirismo, amor e calma.

AGRADECIMENTOS

“E agora, que a glória seja dada a Deus, o qual, por meio do seu poder que age em nós, pode fazer muito mais do que nós pedimos ou até pensamos! [...]” (Efésios 3:20). Agradeço à Deus por me conceder mais uma graça e a oportunidade de seguir meus sonhos, iluminando e dando forças em todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Washington e Sandra por todo amor, incentivo, educação, apoio e felicidade em cada decisão e conquista minha.

Ao meu irmão Wastinho, pelo apoio, contribuição e companheirismo.

À Jean, por me proporcionar paz e positividade, por acreditar em mim, pelo cuidado, respeito, amor e encorajamento.

À minha avó Zezita, Tia Mana (Simone) e toda a minha família pelo apoio, carinho e estímulo ao meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora, Profa. Rosa Dutra, que me acolheu, confiou e se dedicou. Pelos ensinamentos e por tudo, terei sempre gratidão.

Aos colegas de laboratório, agradeço pela equipe que temos, pelo apoio mútuo e coletivo. Em especial, agradeço a Pri e a Lore, amigas que levarei para sempre em minha vida e essenciais em dias difíceis.

À coordenação, professores e funcionários do PPGEB/UFPE, pela contribuição na minha formação científica.

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

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM), representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, apresentando taxa crescente de incidência e mortalidade. Devido a sua relevância e magnitude, métodos analíticos de uso *point-of-care* vem ganhando destaque a partir do desenvolvimento de imunossensores eficientes, rápidos e práticos. Aqui, um imunossensor eletroquímico foi desenvolvido para detecção do H-FABP, recentemente apontado como um importante marcador da isquemia cardíaca. Para construção da plataforma sensora, eletrodos de carbono vítreo foram modificados através do uso de nanotubos de carbono carboxilados e eletrossíntese do polímero condutor PEDOT:PSS, associado ao aminoácido L-Cisteína (NTC/PEDOT:PSS@Cys). Após eletrossíntese, o eletrodo foi funcionalizado com grupamento carboxílicos adicionando-se ácido oxálico à plataforma sensora. Em seguida, uma mistura de EDA, EDC/NHS e anti-H-FABP foi adicionada para exposição de grupamentos amins facilitando as ligações amidas dos anticorpos à plataforma sensora. Após imobilização dos anticorpos, os sítios ativos não-reativos do filme foram bloqueados com uma solução dupla de glicina (100mM) em pH 4,0 e pH 8,0. A caracterização do sensor foi realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica. O filme de NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ác.Oxálico apresentou boa estabilidade quando submetido a sucessivas leituras voltamétricas, não existindo deslocamento significativo dos picos (CV% I_{pa} e I_{pc} aproximadamente 0,5% e 0,2%, respectivamente). A resposta analítica em amostras de soro enriquecido foi obtida por voltametria cíclica. O imunossensor exibiu uma faixa linear de 5,0 a 17,5 ng/mL, limite de detecção em 5,6 ng/mL e limite de reação (*Cut-off*) em 9,62 ng/ml. Apesar de outras plataformas na literatura apresentarem limites de detecção mais baixos, esta mostrou excelente estabilidade com o uso de filmes poliméricos utilizando um composto inovador, o PEDOT:PSS.

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

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI), represents an important public health problem in Brazil and in the world, presenting increasing rate of incidence and mortality. Due to their importance and magnitude, analytical methods of use point-of-care has been gaining detaque from development of imunossensores efficient, fast and practical..Here, an electrochemical immunosensor was developed for the detection of H-Fabp, recently appointed as an important marker of cardiac ischemia. For the construction of the sensing platform, glassy carbon electrodes were modified through the use of carbon nanotubes carboxilados and electrosynthesis driver polymer PEDOT:PSS, associated with the amino acid L-cysteine (NTC/PEDOT:PSS@Cys). After electrosynthesis the electrode was funcionalizado with carboxylic grouping by adding oxalic acid to the sensing platform. Then, a mixture of EDA, EDC/NHS and anti-H-FABP was added for exposure of clusters by facilitating the links polyfunctional amines of antibodies to sending platform,. After immobilisation of antibodies, the active sites non-reactive of the film were blocked with a dual solution of glycine (100mM) at pH 4.0 and pH 8.0. The characterization of the sensor was performed using the technique of cyclic voltammetry. The film NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ác.Oxalic Acid showed a good stability when subjected to successive voltametricas readings, there is no significant displacement of the peaks (CV% Ipa and Ipc approximately 0.5% and 0.2%, respectively). The analytical response in serum samples of enriquecido was obtained by cyclic voltammetry. The Immunosensor exhibited a linear range from 5.0 to 17.5 ng/mL detection limit at 5.6 ng/mL and limit of reaction (Cut-off) at 9.62 ng/ml. Although other platforms in the literature presenting lower detection limits, this showed excellent stability with the use of polymeric films using an innovative compound, the PEDOT:PSS.

Keywords: Immunosensor. Carbon nanotubes. H-Fabp. Acute myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Percentual de acometimento das principais causas de mortes no Brasil.....	16
Figura 2 –	Evolução temporal dos níveis medianos de biomarcadores cardíacos	21
Figura 3 –	Esquema básico de um biossensor.....	24
Figura 4 –	Esquema demonstrativo de um imunossensor marcado e resposta esperada	27
Figura 5 –	Esquema demonstrativo de um imunossensor não marcado e resposta esperada	28
Figura 6 –	Configuração de célula de três eletrodos.....	29
Figura 7 –	Experimento eletroquímico em sistema trieletródico.....	30
Figura 8 –	Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial.....	31
Figura 9 –	Esquema de funcionamento da voltametria por onda quadrada.....	32
Figura 10 –	Representação gráfica da técnica de voltametria cíclica.....	32
Figura 11 –	(A) Excitação; (B) Resposta do sinal na Voltametria Cíclica.....	33
Figura 12 –	Variedade de alótropos de carbono. (a) Fulerenos; (b) Grafeno; (c) Nanotubo de Carbono; (d) Nanoion de carbono; (e) Nanopartículas de Diamante; (f) nanohorn de carbono.....	34
Figura 13 –	Estrutura química de PEDOT: PSS, sua formação de partículas de gel coloidal quando dispersas em água e microestrutura dos filmes resultantes com domínios ricos em PSS (cinza) e domínios ricos em PEDOT: PSS (azul).....	37
Figura 14 –	Configuração estrutural da molécula de L-Cisteína.....	38
Figura 15 –	Configuração estrutural do ácido oxálico.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
μA	Microampére
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Ag	Prata
Au	Ouro
SiO_2	Óxido de Silício
CE	Contra Eletrodo
CK-Mb	Creatinoquinase Fração MB
COOH	Grupo funcional carboxila
CV	Coeficiente de Variação
Cys	L-Cisteína
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
E	Potencial
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
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
Ka	Constante de Ionização do ácido
kDa	Quilodalton
Min	Minutos

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
Nm	Nanômetro
NH ₂	Grupo funcional amina
NTC	Nanotubo de Carbono
NTCs	Nanotubos de Carbono
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEDOT:PSS	Poli-poliestireno sulfonato
PCs	Polímeros condutores
POCT	Teste a beira leito, do inglês, <i>Point-of-care testing</i>
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SERS	Ressonância plasmônica de superfície e espectroscopia Raman aprimorada de superfície
SWCNT	Nanotubos de Carbono de parede simples, do inglês, <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	16
2.1.1	Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio	17
2.1.2	Proteína de Ligação a Ácidos Graxos do Coração (H-FABP)	20
2.1.2.1	Métodos diagnósticos do H-FABP.....	22
2.2	BIOSSENSORES	23
2.2.1	Métodos de transdução	24
2.2.1.1	Transdução Eletroquímica	25
2.2.2	Imunossensores	26
2.2.2.1	Tipo de detecção em Imunoensaios	26
2.2.2.2	Imunossensores não marcados	27
2.2.3	Técnicas e análises eletroquímicas	28
2.2.3.1	Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	30
2.2.3.2	Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)	31
2.2.3.3	Voltametria Cíclica (VC)	32
2.2.4	Materiais empregados na superfície sensora	33
3	OBJETIVO	39
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	RESULTADO	40
4.1	ARTIGO 1 - IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE NANOHÍBRIDO POLIMÉRICO PARA DETECÇÃO DO H-FABP, UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	40
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são alterações que afetam as funções responsáveis por carrear oxigênio e nutrir os tecidos celulares para o seu pleno desempenho (COSTA, et al. 2019). Destas, a principal etiologia é o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) que constitui um grande desafio terapêutico, com impacto considerável na morbimortalidade e incidência anual estimada de 5,0-8,0%, altas taxas de hospitalização e elevados custos à saúde pública mundial (OMS, 2017; BRAILE-STERNIERI, et al. 2018).

A abordagem emergencial ao paciente com suspeita de IAM, deve ser rápida e direcionada com o objetivo de facilitar o tratamento imediato e reduzir possíveis danos permanentes ao indivíduo (MARTINEZ et al, 2019); todavia, desafios inerentes à confirmação diagnóstica da doença é evidenciada devido a sua similaridade com outras patologias cardiovasculares.

Atualmente, quando na presença de quadro clínico sugestivo, o paciente com suspeita de IAM realiza o exame de eletrocardiograma (ECG) e por meio dos traçados sugestivos pode-se determinar a probabilidade da ocorrência do evento isquêmico. Entretanto o ECG por possuir baixa sensibilidade (~50%) não é considerado um exame de confirmação diagnóstica, necessitando da utilização de novos métodos ou abordagens diferenciais (HARROGATE et al., 2019).

O emprego de biomarcadores cardíacos para auxílio diagnóstico do IAM é atualmente considerada uma boa estratégia devido à eficácia de diferenciação na indicação de processos patogênicos mediados pela liberação de componentes intracelulares na corrente sanguínea em concentrações mais elevadas que as usuais, especificidade e sensibilidade para detectar lesões miocárdicas, reprodutibilidade, precisão e limites discriminatórios para distinguir entre níveis patológicos e fisiológicos. (BENJAMIN; MUNTNER; BITTENCOURT, 2019). Estudos mostram que pelo menos 4 a 8% dos pacientes com IAM em evolução são erroneamente liberados das emergências sem a análise de marcador em série que possibilitaria um diagnóstico adequado, resultando em uma maior taxa de mortalidade a curto prazo (ENGEL; ROCKSON, 2020).

Os altos níveis de biomarcadores cardíacos são induzidos pelo processo de ativação por liberação desses componentes estruturais rapidamente após dano nos cardiomiócitos e consequente morte celular. Atualmente, os importantes biomarcadores cardíacos para o diagnóstico de IAM são troponina cardíaca I (cTnI) e

T (cTnT), mioglobina (Mb), creatina quinase-MB (CK-MB) e, mais recentemente, a proteína de ligação a ácidos graxos do coração (H-FABP) (YOUSEFI et al., 2019).

O H-FABP é um tipo de proteína intracardíaca, extremamente sensível nas primeiras horas após a lesão do miocárdio e durante a reperfusão, que desempenha um papel essencial no metabolismo de ácidos graxos nos cardiomiócitos (YE et al., 2018). Clinicamente, a elevação do H-FABP na circulação indica dano histórico ou contínuo aos miócitos e é um marcador útil para monitoramento e gerenciamento da terapia em diversos problemas cardiovasculares (HO et al., 2019). Além disso, podem ser cruciais na previsão de risco futuro de eventos cardíacos, e ser útil para monitorar os danos do miocárdio induzidos pela ablação por radiofrequência de arritmias e angioplastia coronariana (DELLAS, et al. 2018).

Sabe-se, hoje, que a cTnT supera ligeiramente o H-FABP, uma vez que após as 4 horas do início dos sintomas a sensibilidade das moléculas se equiparam, todavia, a combinação da elevação de ambos marcadores proporciona uma melhora significativa na sensibilidade, além de melhorar o valor preditivo negativo, a relação de verossimilhança negativa e a relação de risco, resultando em um ótimo desempenho (OLIVEIRA; SANTOS; HOFFMANN, 2018). Já a especificidade da H-FABP é significativamente menor do que cTnT, isso devido à elevação da H-FABP em outras condições, além do alto nível das FABPs na musculatura esquelética, que estruturalmente é igual à cardíaca, podendo resultar em valores alterados deste marcador (NSABIAMA, et al. 2019). O conteúdo miocárdico da H-FABP (0,57 mg = g de peso úmido) é quatro a cinco vezes menor que o da MB (2,7 mg = g de peso úmido), mas a concentração de referência plasmática do H-FABP é 19 vezes maior que o da MB, isso significa que, após lesão, o gradiente plasmático é quase cinco vezes maior para H-FABP do que para MB, fazendo com que o H-FABP no plasma suba acima sua concentração de referência após o início do IAM, permitindo um diagnóstico precoce (Wafa et al., 2018; WILLEMSEN et al. 2019).

Visto que o uso do H-FABP como ferramenta diagnóstica no IAM é uma aplicação recente, atualmente os ensaios comerciais existentes no mercado se baseiam em métodos clássicos, por meio do reconhecimento antígeno-anticorpo (AG-AC), como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de fluorescência ou detecção radioquímica (GRABOWSKA et al., 2018); e, apesar do abrangente desenvolvimento de tais métodos, suas principais desvantagens referem-se aos longos períodos de análise e problemas de reatividade cruzada, sendo assim

considerados pouco sensíveis e de uso limitado. Tais desvantagens podem ser superadas pelo uso de dispositivos analíticos portáteis, uma vez que esses têm grande potencial para minimizar o tempo entre o diagnóstico e o tratamento apropriado.

Os dispositivos biossensores eletroquímicos são os principais candidatos ao desenvolvimento de testes de diagnóstico baratos, descartáveis e sensíveis, por possuírem boa resposta, possibilidade de operação em temperatura ambiente e fabricação com tecnologias de alto rendimento (DU et al., 2020). São configurados a partir de um componente biológico ligado a um transdutor capaz de converter o sinal gerado pela interação biológica entre biomoléculas em um sinal mensurável (WANG et al., 2020). Quando o reconhecimento da molécula de interesse é dado pela formação de imunocomplexos, este biossensor recebe o nome de imunossensor que resultam em respostas altamente seletivas e específicas (OLIVEIRA; SILVA; COELHO; CORREIA, 2019).

A possibilidade do desenvolvimento de dispositivos à beira do leito, chamados de “POCT”, do inglês *“point-of-care testing”*, revela vantagens relacionados ao menor tempo de resposta para o diagnóstico (CECCHETTO et al., 2020), realizando a quantificação baseada na reação de interação AC-AG como elemento de reconhecimento em faixas de concentrações muito baixas (imuno-POCT’s) (VASANTHAM et al., 2020). Alguns dos desafios no desenvolvimento de imuno-POCT’s práticos, rápidos e efetivamente competitivos a uma tecnologia “à beira do leito” consiste em concomitantemente: a) alcançar baixos limites de detecção; b) promover uma rápida resposta, ou seja, gerar um sinal elétrico imediato à interação AG-AC, dispensando o uso de marcadores conjugados que se rendem a oxidar ou reduzir espécies eletroativas para geração do sinal elétrico; c) alcançar boa especificidade; d) fazer uso de tecnologias transdutoras facilmente portabilizadas e aliadas a um baixo custo, e e) alcançar boa reprodutibilidade (PARLAK et al., 2020; TSUTSUI, et al. 2020).

Outro aspecto bastante importante na construção de um imuno-POCT, se refere a introdução de nanomateriais que permitem o aumento da área de imobilização da molécula, a promoção da reação eletroquímica e o aumento de sinal do bioreconhecimento, sendo a sensibilidade e alta condutividade por área (alta razão de aspecto) os maiores atributos que o uso de nanomateriais podem oferecer na construção de um imuno-POCT (KOUR et al., 2020). A conjugação de nanotubos de

carbono (NTC) à polímeros condutores (PCs), como os derivados do tiofeno (VILLEMIN et al., 2019), tem sido bastante utilizada devido propriedades específicas, como estabilidade, processabilidade e fácil preparação, ainda permitem controlar as propriedades das superfícies eletródicas e funcionalização das plataformas. Entre PCs derivados de tiofeno, o poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) (PEDOT:PSS) apresenta como vantagens o fornecimento dos estados dopados altamente condutores e especialmente estáveis, uma gama de propriedades ópticas com intervalos de banda eletrônicos variando em todo o espectro visível e propriedades redox aprimoradas, tornando-os úteis para vários dispositivos eletroquímicos (PORCU et al., 2020; CAI et al., 2020).

Todavia, não apresenta grupos funcionais amino reativos, impossibilitando ser utilizado para imobilização covalente de biomoléculas. Desta forma, o uso da L-Cisteína (Cys), como agente modificadora da estrutura conformacional do filme polimérico, torna-se importante via de ligação molecular por meio da interação com o grupamento amina presente na estrutura (ZHANG et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho descreve uma plataforma na qual foi formada por um filme polimérico condutor de PEDOT:PSS associado à Cys, pela formação de um copolímero, e NTC. 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 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.

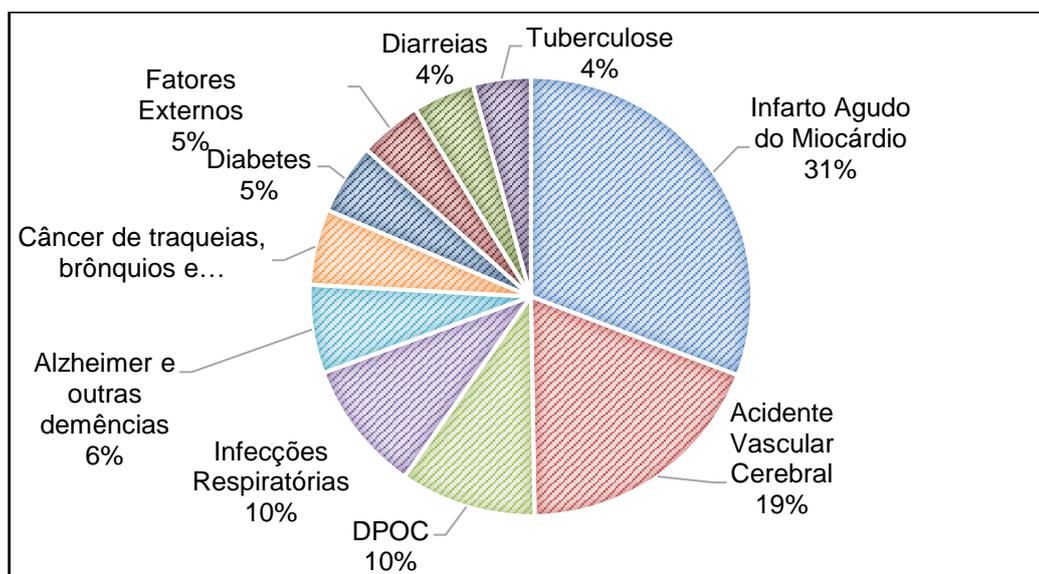
2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção encontra-se o referencial teórico da pesquisa.

2.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença isquêmica do coração representa uma das principais causas de óbito em homens e mulheres acima de 30 anos (Figura 1). A elevada proporção de óbitos precoces por doenças isquêmicas do coração no Brasil é muito superior a países como Estados Unidos, Cuba, Argentina, Dinamarca e Japão. Cerca de 300 a 400 mil pessoas sofrem infartos todos os anos, sendo fatal em 30% dos casos (SOUZA-SILVA et al. 2019).

Figura 1 – Percentual de acometimento das principais causas de mortes no Brasil



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2017).

Esse fato pode ser justificado tanto pela mudança da estrutura etária da população, quanto pelo aumento da prevalência de exposição aos fatores de risco reconhecidamente associados às doenças do aparelho circulatório (BORBA; HUBERT; GIARETTA; BODANESE, 2016), tais como o sedentarismo, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo II, história familiar de Doença Arterial Coronariana precoce (homem < 55 anos e mulher < 65 anos), dislipidemia e obesidade, além das desigualdades socioeconômicas e de acesso aos serviços de saúde (SANTOS, et al. 2018).

De acordo com o Departamento de Informática do SUS (DATASUS), até o mês

de setembro de 2019 houve registro de 96.411 internamentos por IAM, com gastos totais de mais de 300 milhões de reais e taxa de mortalidade de 10% em relação ao total de óbitos anual (DATASUS, 2019).

Estima-se que 4 milhões de pessoas são atendidas por dor torácica anualmente no Brasil, com alto índice de mortalidade, que é atribuída às dificuldades no acesso do paciente com dor torácica ao tratamento em terapia intensiva, aos métodos de intervenção invasiva (reperusão de coronárias) e às medidas terapêuticas adequadas. Nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 5,8 milhões das 113 milhões de visitas ao pronto atendimento são por dor torácica, todavia apenas uma pequena proporção (15% a 25%) desses pacientes apresenta diagnóstico confirmatório de IAM (ALVES; NASCIMENTO; BARBORANA; CRUZ, 2019). A redução na mortalidade por esse acometimento está pautada no imediato atendimento dos pacientes após o início dos sintomas (LEI; BIN, 2019).

A fisiopatologia do IAM ocorre quando nos primeiros 30 minutos após a oclusão coronariana, os cardiomiócitos privados de oxigênio mudam de metabolismo aeróbico a anaeróbico resultando em uma cascata de anormalidades celulares que, quando da progressão, resultam na irreversibilidade celular, dano e necrose miocárdica (NOVO; NUGARA; LANCELOTTI, 2019). A depleção de ATP resulta em perda de potencial de membrana, inchaço celular e, eventualmente, integridade prejudicada da membrana celular, do influxo de cálcio e outros desequilíbrios moleculares. O resultado disso é uma região de isquemia miocárdica, cuja extensão total é geralmente completa dentro de 6 horas. O diagnóstico do IAM, mais comumente, requer a apresentação de sintomas isquêmicos, alterações do eletrocardiograma (ECG) e mudança nos biomarcadores cardíacos (MOORE 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, conseqüentemente desfavorecidas de um atendimento rápido e especializado que torna-se crucial para reversão do quadro clínico, uma vez que o efeito deletério da isquemia cardíaca é dependente da detecção rápida do início do evento (GREENSLADE et al., 2020) . Para diagnóstico do IAM, os pacientes devem apresentar pelo menos duas das três

condições estabelecidas pela OMS: dor precordial característica, alterações no ECG e elevação dos marcadores cardíacos (PADHY et al., 2020; GRIMM et al., 2020).

A dor precordial peculiar ao IAM, é caracterizada por um forte desconforto agudo com duração média de 20 minutos (INGREMEAU et al., 2020). Pode apresentar-se de forma atípica principalmente no epigástrico (frequentemente confundido com patologia digestiva), braços, ombros, mandíbula e costas; associados ou não, à dispneia devido a insuficiência ventricular esquerda, náusea, vômito, diaforese ou síncope. A dor se caracteriza por ser geralmente opressiva e ardente, embora estudos relatem que em 25% dos pacientes infartados os sintomas são silenciosos (SILVA; MELO; NEVES, 2019).

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 musculo cardíaco, fornecendo um traçado fisiológico característico, permitindo assim a identificação de uma possível cardiopatia (PEREIRA et al., 2019). Entre os achados eletrocardiográficos do IAM estão: a elevação do segmento ST superior a 1 mm (0,1 mV) em duas ou mais derivações contíguas (derivações V2-V3 \geq 2,5 mm (0,25 mV) em homens com menos de 40 anos, \geq 2 mm naqueles com \geq 40 anos, e \geq 1,5 mm (0,15 mV) em mulheres; a depressão do segmento ST de V1-V4 e história sugestiva de IAM que podem corresponder a um IAM inferobasal (posterior); o aparecimento de ondas T hiperagudas (fase inicial do IAM), mesmo sem elevação do segmento ST (PAZOS et al. 2018) . Apesar disso, um ECG normal não exclui o IAM em presença de quadro clínico característico, aspecto de grande importância na tomada de decisões no serviço de emergência, uma vez que o paciente sintomático e apresentando eletrocardiograma negativo (cerca de 50%) deve ser admitido para acompanhamento e confirmação diagnóstica a partir dos resultados enzimáticos ou alterações eletrocardiográficas evolutivas (IBANEZ et al., 2018). Também é necessário levar consideração que existem achados eletrocardiográficos de outros processos patológicos que podem confundir o diagnóstico do IAM.

Diante disso, o uso de biomarcadores cardíacos apresenta-se como estratégia alternativa no diagnóstico preciso do IAM, devido à sua eficácia de diferenciação na indicação de processos patogênicos mediados pela liberação de componentes intracelulares na corrente sanguínea em concentrações mais elevadas que as usuais (BENJAMIN; MUNTNER; BITTENCOURT, 2019). Tais componentes são

considerados como potenciais marcadores devido a especificidade e sensibilidade para detectar lesões miocárdicas, reprodutibilidade, precisão e limites discriminatórios para distinguir entre níveis patológicos e fisiológicos.

O relacionamento entre os altos níveis de biomarcadores cardíacos e danos nos cardiomiócitos foram descobertos nos últimos anos, cujo processo de ativação ocorre por meio da liberação de inúmeros marcadores rapidamente após a morte do miócito (FABBRI et al., 2019).

Atualmente, os importantes biomarcadores cardíacos para o diagnóstico de IAM são as cTnI e cTnT, consideradas o “padrão-ouro” na confirmação do IAM, cujo aumento acontece após 2 a 4 horas do início da injúria, pico em 12 horas e permanência até 4-14 dias em média (WELSH et al., 2019; MORROW, 2018); a Mb, considerada o biomarcador convencionalmente mais sensível do IAM, no entanto, apresenta menor especificidade para necrose comparada a cTnI; e sua expressão pode ser identificada com regulação positiva em distúrbios não cardíacos, como doença ou lesão muscular esquelética e insuficiência renal crônica, com elevação inicial semelhante ao da cTnI, entre 4 a 8 horas, pico de elevação entre 12 a 24 horas e permanência por até 72 a 96 horas (ZOU; TU, 2019); e, a CK-MB, que é relativamente específica para o tecido miocárdico, encontrada dentro de 4 a 6 horas e raramente às 12 horas após o início da isquemia, permanência dentro de 36 a 48 horas e, portanto, às vezes ainda são usados para avaliar o reinfarto após a intervenção (DAMHOFF; HUECKER, 2019).

Embora a combinação de detecção e monitoramento atento desses três marcadores provar ser eficaz na detecção do IAM, ainda existe a necessidade de incorporação de novos biomarcadores com maiores sensibilidades e especificidades, especialmente no estágio muito inicial da lesão do miocárdio (PANDYA; BOLLAPALLI, 2018).

A proteína de ligação a ácidos graxos do tipo coração (H-FABP) é um tipo de proteína intracardíaca da classe das FABPs, cujas funções fisiológicas facilitam o transporte de ácidos graxos de cadeia longa (AMIRI, et al. 2018), sendo liberadas rapidamente no interstício e no plasma após injúria tecial e danos celulares (XIAO; LU; FAN; YANG, 2019).

Hoje, reconhecidamente são classificadas 9 isoformas abundantes em tecidos específicos, compartilhando níveis variados de sequência e homologia estrutural (~30-70%) (GOLASZEWSKA; HARASIM-SYMBOR; POLAK-IWANIUK; CHABOWSKI,

2019). Apesar disso, todas as isoformas exibem epítomos únicos reconhecidos por anticorpos com alta especificidade e baixa reatividade cruzada (inferior a 5%) (FALOMIR-LOCKHART; CAVAZZUTTI; GIMÉNEZ; TOSCANI, 2019).

2.1.2 Proteína de ligação à ácidos graxos do coração (H-FABP)

A H-FABP, do inglês *Heart-Type Fatty Acid Binding Protein*, é uma proteína de ligação lipídica não enzimática de baixo peso molecular (15 kDa), composto por 133 aminoácidos, codificada pelo gene FABP3 e localizada no cromossomo 1p32-p35 (ULUKAN, et al. 2019). Encontra-se em abundância no músculo cardíaco e em menor proporção no músculo esquelético e liso, glândulas suprarrenais, testículos, glândulas sebáceas, pulmão, intestino, trato urogenital, glândula mamária em lactação, rim, cérebro e placenta (BACE et al., 2018).

A função fisiológica do H-FABP é transportar ácidos graxos de cadeia longa da membrana celular para o sistema intracelular, o que o torna um poderoso regulador do sistema β -oxidativo mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa no coração (MCKILLOP; GIRARDI; THOMPSON, 2019). A expressão de H - FABP é regulada pelo microRNA miR - 1, que pode desempenhar um papel na progressão da própria insuficiência cardíaca. Como resultado da lesão miocárdica, o H-FABP é liberado na circulação, onde são observados níveis máximos dentro de 1 a 3 horas após o dano, podendo ser detectada tão cedo quanto 30 minutos, retornando normalmente aos valores basais dentro de 12 a 24 horas (ATAY, 2019).

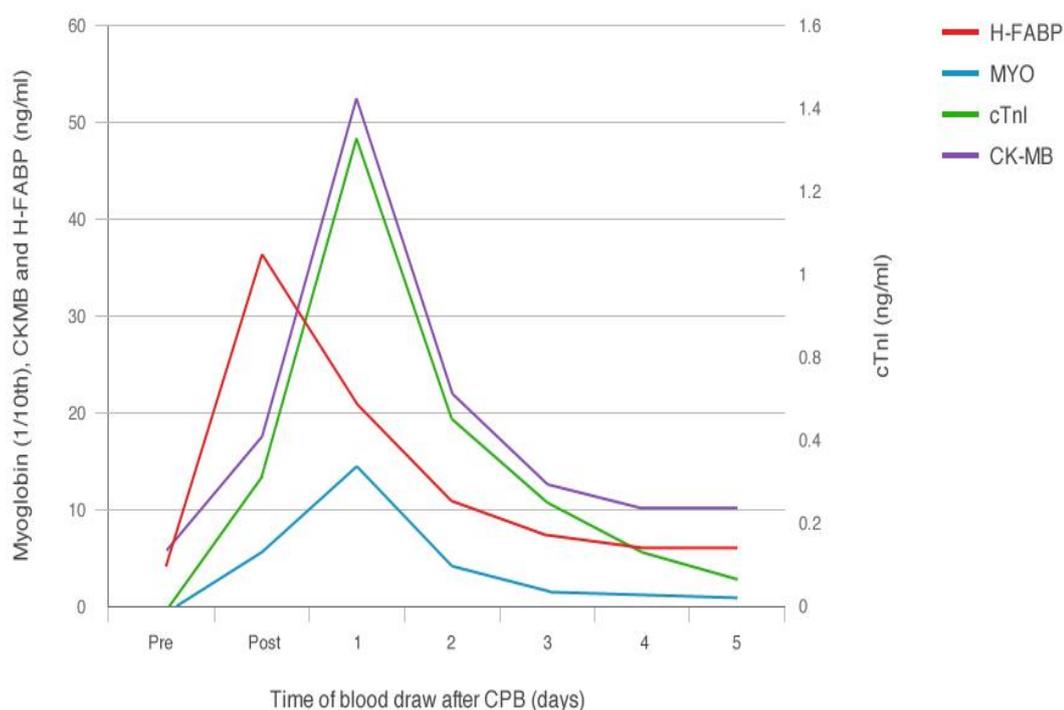
O H-FABP é expresso mais abundantemente nos ventrículos do coração (0,46 mg/g de peso úmido) e átrios (0,25 mg/g de peso úmido) do que nos músculos esqueléticos (REZAR et al., 2020), constituindo 5 a 15% da proteína citoplasmática no coração humano. Com uma concentração de referência de cerca de 5 ng/mL, os níveis de H-FABP geralmente permanecem baixos no plasma (AL-HADI; WILLIAM; FOX, 2009). O H-FABP como biomarcador oferece alta sensibilidade em todo o espectro da SCA. A combinação de alta sensibilidade, precocidade e especificidade do H-FABP o torna um biomarcador promissor para diagnóstico precoce e tratamento de IAM e SCA que poderia ser superior ao comumente aplicado (ZHANG et al., 2019).

A eliminação do H - FABP ocorre através do rim, após a lesão miocárdica, o H - FABP é rapidamente liberado dos miócitos explicando uma janela diagnóstica mais curta em pacientes com função renal normal (LAGERSTEDT, et al. 2018). Clinicamente, a elevação do H-FABP na circulação indica dano histórico ou contínuo

aos cardiomiócitos e é um marcador útil para monitoramento e gerenciamento da terapia em diversos problemas cardiovasculares (HO et al., 2019); além disso, podem ser crucial na previsão de risco futuro de eventos cardíacos, e ser útil para monitorar os danos do miocárdio induzidos pela ablação por radiofrequência de arritmias e angioplastia coronariana (DELLAS, et al. 2018).

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; XU; DIOLINTZI; STORCH, 2019) . Outros benefícios 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 (Figura 2).

Figura 2 - Evolução temporal dos níveis medianos de biomarcadores cardíacos.



Fonte: Muehlschlegel *et al.* (2010).

Kabekkodu et al. (2016), em estudo relataram que a sensibilidade do H-FABP na detecção de IAM em pacientes que se apresentam dentro de 4 horas após o início dos sintomas foi de 60%, significativamente superior à da troponina (18,8%) e da CK-MB (12,5%). A sensibilidade do H-FABP na detecção do IAM agudo entre 4 a 12 horas

após o início dos sintomas foi de 86,96%, comparável à troponina (90,9%) e superior à CK-MB (77,3%). Todavia, a especificidade do H-FABP na detecção do IAM apresentou-se menor que a da troponina e da CK-MB. Embora a TnT ofereça também excelente sensibilidade para o diagnóstico de IAM, é altamente propensa a falsos positivos devido a elevações não relacionadas à SCA. O H-FABP, por sua vez, oferece uma sensibilidade similarmente excelente, porém com o benefício adicional da redução de falsos positivos, especialmente em pacientes que vão à emergência hospitalar no início da injúria miocárdica.

Em outro estudo mais recente, Anvari et al. (2018) avaliaram as alterações do H-FABP ao longo do tempo, pelo qual estimou um ponto de corte de 7,15 ng/ml, com sensibilidade de 51,5%, especificidade de 96,3% e precisão diagnóstica de 68,3%. A área sob a curva característica operacional do receptor para H-FABP em 8 horas foi de 79,4% (intervalo de confiança de 95%: $P < 0,001$). Tal variação pode indicar a influência de inúmeros fatores, bem como a diversidade de populações e ambientes no estudo. Além disso, a maior sensibilidade foi para H-FABP medido em 4 horas (88%), ratificando os resultados anteriormente publicados em estudos de avaliação enzimática, sugerindo ainda a utilização do marcador como adjuvante nas condutas imediatas e redução de tempo de internação de pacientes com suspeitas de IAM.

2.1.2.1 Métodos diagnósticos do H-FABP

As tecnologias atuais para a detecção de H-FABP incluem o teste de ELISA, a quimioluminescência, o imunoensaio turbidimétrico e o imunoensaio cromatográfico de fluxo tardio de ouro coloidal (kit comercial). Sendo o teste de ELISA e o Kit comercial, os mais amplamente utilizados para diagnóstico do IAM (ZEBROWSKA et al., 2019).

Diversos kits comerciais são hoje comumente fornecidos, pelos quais determinam um diagnóstico rápido (cerca de 15 a 20 minutos), a exemplo do MBS020502 Kit Elisa de sanduíche quantitativo (Faixa de detecção: 0,5 ng/ml - 16 ng/mL e Sensibilidade: 0,1 ng/mL); Kit humano H-FABP ELISA (ab243682) (Sensibilidade: 2,4 pg / ml e Alcance: 10,9 pg/ml - 700 pg/ml); e, kit ELISA da HycultBiotec (Nível de detecção: 102 pg/ml). No entanto, a maioria dos kits de imunoensaio no mercado possui apenas um único indicador. Apesar da elevada sensibilidade, esse teste requer um tempo elevado de espera, além de consistir em

um método de custoso pela necessidade de equipamentos específicos e profissionais especializados, impossibilitando sua integral disponibilidade em emergências de todo o mundo. O imunoensaio cromatográfico de fluxo tardio de ouro coloidal (Medix Biochemica) é atualmente bastante utilizado para detecção quantitativa do IAM, com um limite mínimo de detecção de 1,5 mg/ml. Outro teste cromatográfico utilizado refere-se ao CardioDetect®, com sensibilidades entre 76,6% e 94,4% e especificidades entre 88,2% e 81,7%. Os dados obtidos são geralmente simples, incompletos, com baixa sensibilidade e especificidade de detecção e não podem refletir completamente a situação do IAM precoce nos pacientes, o que o torna propenso a erros ou atraso no diagnóstico.

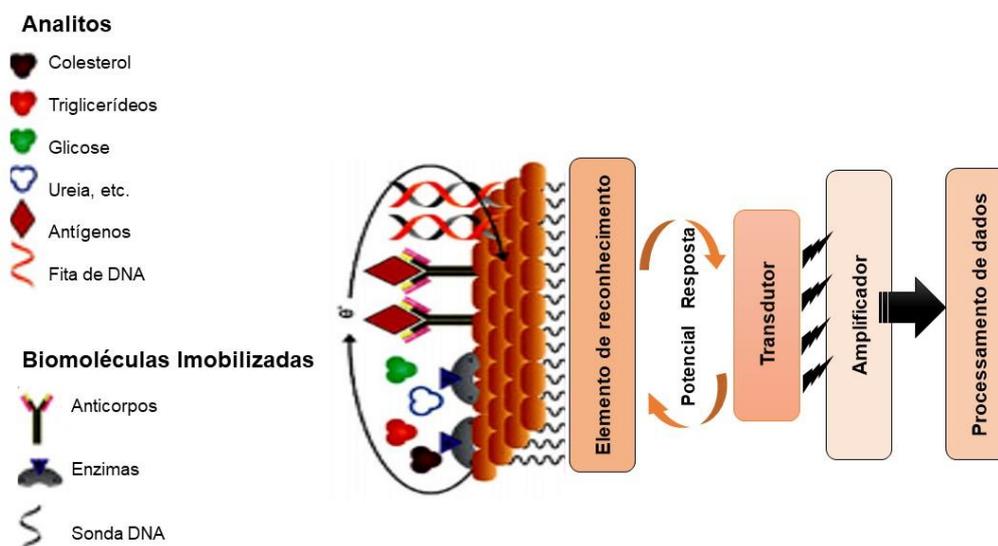
Além de os testes de imunoensaios cromatográficos terem baixa especificidade diagnóstica (43%) (BANK et al., 2016), os ensaios H-FABP atuais têm uso limitado. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores é de suma importância, uma vez que são testes rápidos, práticos e quantitativos.

2.2 BIOSSENSORES

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico capaz de detectar um analito-alvo através da ligação ou interação específica um material biológico, como enzimas, anticorpos ou sequências de ácidos nucleicos projetadas (QIAN et al., 2019). Estruturalmente são construídos a partir de um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade de processamento de sinal.

Diversas técnicas podem ser introduzidas para a análise de reações de biossensor entre moléculas sensoras e materiais-alvo, incluindo análises eletroquímicas, de fluorescência e de propriedades ópticas, medições de ressonância plasmônica de superfície e espectroscopia Raman aprimorada de superfície (SERS) (YOON et al., 2020). Com base no princípio de operação, os elementos de reconhecimento utilizados nos biossensores podem ser, entre outros, antígenos e anticorpos (DEBNATH; DAS, 2019) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema básico de um biossensor



Fonte: Adaptado de NARWAL *et al.* (2019).

A aplicação dos biossensores depende do fenômeno ou propriedade que se deseja avaliar. Para cada amostra tem-se a combinação do material biológico a ser empregado e o transmissor mais apropriado para as condições em questão (GAUDIN, 2017). A classificação dos biossensores varia de acordo com o tipo de sistema em que este é constituído e o elemento de transmissão que é empregado e utilizado de forma acoplada ao componente biológico. O emprego de cada tipo de transdutor vai depender da característica de cada material, como *band gap* e resposta a interação com outros elementos que constitui o biossensor (SALOMÃO, 2018).

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 (MITTAL; KAUR; GAUTAM; MANTHA, 2017). Podem ainda ser classificados quanto a sua atividade e funcionamento, em: a) Piezoelétrico: baseados no acoplamento de um bioelemento com um piezoelétrico componente, geralmente um cristal de quartzo revestido com ouro, que produzirá uma modificação de massa no cristal, perceptível por meio de sua frequência de oscilação; b) Ópticos: baseados em métodos como absorção de UV-Vis, medições de bio/quimioluminescência, fluorescência, refletância e índice de refração, usados para analisar a interação do biocatalisador com o analito alvo através

de alterações da radiação eletromagnética; c) Calorimétricos: medidos a partir do calor da reação resultante da interação do elemento de reconhecimento e analito alvo; e, d) Eletroquímicos: cuja reação química entre a biomolécula imobilizada e o analito alvo produzem ou consomem íons/elétrons, afetando propriedades elétricas mensuráveis da solução (LI et al.,2019).

2.2.1.1 Transdutores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são extremamente atraentes quando comparados a outros, devido à sua detectabilidade única, simplicidade experimental, fácil manuseio, portabilidade e relação custo-benefício. Possuem uma posição de destaque entre os sensores atualmente comercializados e são bem reconhecidos pela ampla gama de aplicações na área da biomedicina, além disso esse tipo de sensor pode funcionar como um dispositivo miniaturizado para testes no ponto de atendimento (POCT). Geralmente, os sensores eletroquímicos compreendem dois elementos básicos, (a) um sistema de reconhecimento molecular que é a parte mais significativa de um sensor e (b) um sistema físico-químico de transdutores que é um componente que converte a resposta química ou biológica em um sinal que pode detectado por dispositivos elétricos (MANSURIYA et al., 2020).

O transdutor eletroquímico utilizado nos biossensores pode ser distinguido como: potenciométrico, condutométrico, impedimétrico e amperométrico. Nas medições potenciométricas, a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência é determinado por um voltímetro quando não há corrente significativa fluindo através deles. A diferença de potencial é medida devido à oxidação e redução das espécies em uma solução de amostra (DAI; ZHANG; HONG; LIN, 2016).

Nas medições condutométricas, existe uma relação entre um bioreconhecimento evento e condutância. Enquanto ocorre uma reação, uma mudança na concentração de espécies iônicas leva a alterar a condutividade elétrica ou o fluxo de corrente da solução. O biossensor condutométrico consiste em dois eletrodos de metal (geralmente platina ou prata) separados por um certa distância. Um ohmímetro (ou multímetro) é usado para medir a mudança na condutância entre os eletrodos de metal (XU, 2016).

Nas medidas impedimétricas, quando o bioreconhecimento pela biomolécula ocorre na superfície modificada, as propriedades interfaciais mudam. Assim, biossensores impedimétricos podem ser usados determinar parâmetros quantitativos

de propriedades eletroquímicas. Reações eletroquímicas envolvem resistência a eletrólitos, adsorção de espécies eletroativas, transferência de carga na superfície do eletrodo e transferência de massa da solução a granel para a superfície do eletrodo. Cada processo de reação representado por um circuito elétrico consiste em resistência, capacitores ou elementos de fase constante combinados em paralelo ou em série (JIN et al., 2017).

Os biossensores amperométricos, por sua vez, medem a corrente ou o potencial resultante de uma reação química de materiais eletroativos na superfície do transdutor enquanto um potencial ou corrente constante, respectivamente, é aplicado. A mudança na corrente está relacionada à concentração das espécies-alvo (RAMONAS et al., 2019)

2.2.2 Imunossensores

Os imunossensores são sensores de afinidade baseados na interação anticorpo-antígeno (AC-AG), nos quais a detecção do antígeno é resultado da ligação específica a determinadas regiões do anticorpo na superfície do eletrodo (ZHANG; MILLER, 2019). Essa ligação compreende uma constante de alta afinidade ($K_a = 10^{12}-10^{14}$), pelo qual o anticorpo atua como um bioreceptor e antígeno como um analito alvo, sendo o transdutor capaz de quantificar essa interação (BALAHURA; STADEN; STADEN; ABOUL-ENEIN, 2019).

2.2.2.1 Tipos de detecção em imunoenaios

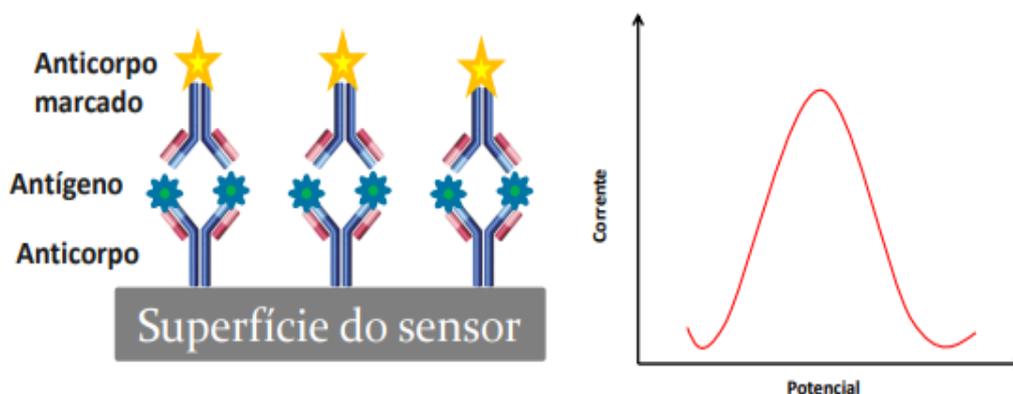
O desenvolvimento de um imunossensor requer uma estratégia para monitoramento da reação de afinidade, uma vez que o antígeno e o anticorpo são espécies eletroquimicamente inertes. Dentre os imunossensores eletroquímicos podem ser citados os marcados e não marcados, ou seja, o dispositivo pode detectar diretamente a interação Ag-Ac, ou pode detectá-lo por meio do reconhecimento de um marcador que irá sinalizar o local de ocorrência da formação do complexo biológico (RAPP; GRUHL; LÄNGE, 2010).

Os imunossensores do tipo “marcados”, tem por objetivo sinalizar o elemento de reconhecimento biológico para quantificar o analito detectado durante a fase de incubação, capazes de sofrer oxidação e redução (sonda redox), resultando na geração do sinal. Por outro lado, os sensores não marcados reconhecem a formação do imunocomplexo na superfície do transdutor sem qualquer marcação, apresentando

como vantagem crucial a simplicidade de sua operação, o fato de dispensarem reagentes adicionais para a marcação e a detecção em etapa única (FARIA, 2017).

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 (em sonda redox) que serão responsáveis pela geração do sinal, como demonstrado na Figura 4 (ZANATO, 2016).

Figura 4 - Esquema demonstrativo de um imunossensor marcado e resposta esperada.



Fonte: Zanato (2016).

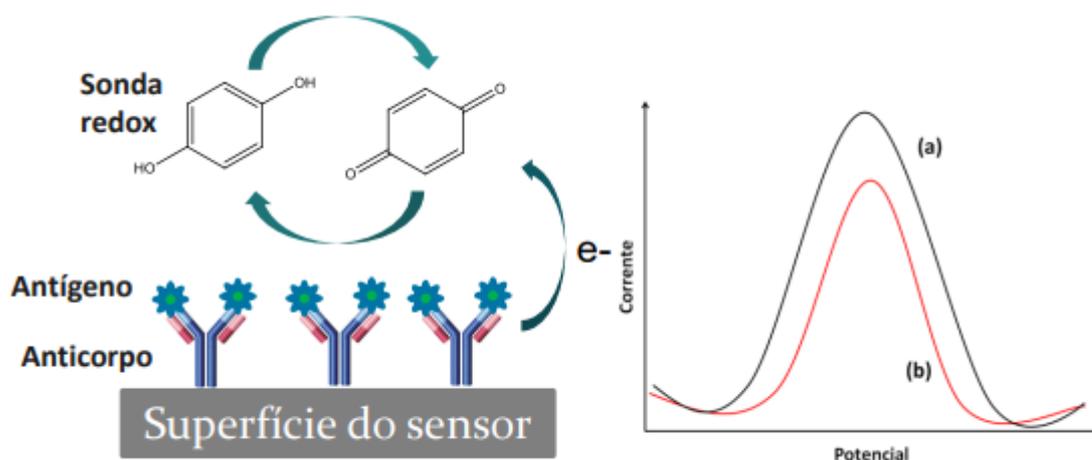
Apesar de seletivo e com grande potencial para detecção de baixas concentrações, este método resulta em elevados custos operacionais, incluindo tempo de ensaio mais longo com o aumento das etapas de processamento da amostra (GOPINATH et al., 2014).

2.2.2.2 Imunossensores não marcados

Os sensores não marcados (*label-free*), reconhecem a formação do imunocomplexo sem a utilização de anticorpos ou antígenos conjugados a enzimas ou moléculas eletroativas. A formação do imunocomplexo pode ser observada pela supressão do sinal em relação ao sinal inicial (pico base). Esta supressão é proporcional a concentração do antígeno que bloqueia parcialmente a superfície eletroativa do imunossensor (Figura 5) (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).

A atual 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. 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, são mais comumente utilizadas (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, como apresentado na 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 e resposta esperada.



Fonte: Zanato (2016).

2.2.3 Técnicas e análises eletroquímicas

Como plataforma analítica, sensores eletroquímicos são normalmente rápido (detecção em menos de um minuto), menos custosos, possuindo alta sensibilidade e baixos limites de detecção (nM); ideais para miniaturização e análise no ponto de atendimento. Em síntese, a eletroquímica investiga a transferência de carga nas

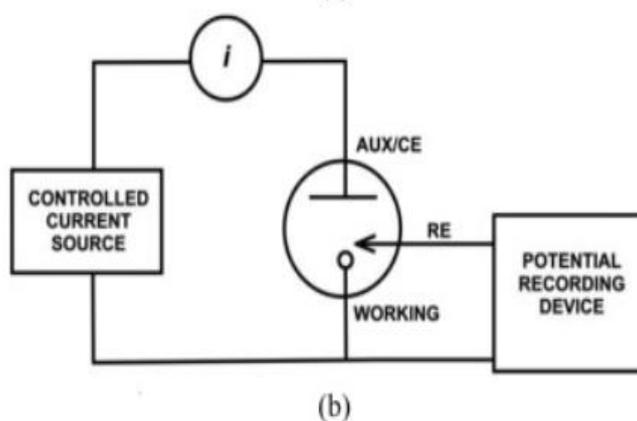
interfaces. Considerar uma reação redox de um elétron de uma espécie r em sua forma reduzida (r^n) e formas oxidadas (r^{n+1}) (Equação 1),



A um potencial (E), pode-se conduzir a reação direcionada para oxidar r em r^{n+1} ou reduzir r^{n+1} em r . Isso resulta em um fluxo de elétrons sob a forma de uma corrente (i). Essa corrente é diretamente proporcional à concentração das espécies em solução, facilitando a quantificação (ISLAM et al., 2020).

A configuração experimental para este método consiste em um sistema trieletródico, que utiliza um eletrodo de trabalho (ET), um eletrodo de referência (ER) e um contra eletrodo (CE) em célula convencional (Figura 6). As informações do 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).

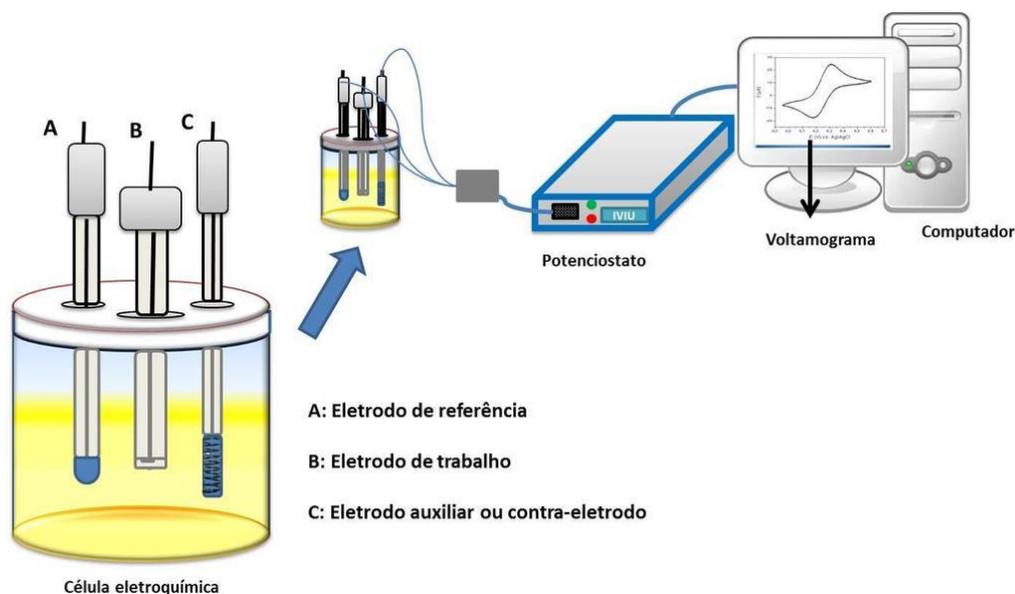
Figura 6 - Configuração de célula de três eletrodos



Fonte: Bansod (2017)

Esses eletrodos são conectados eletricamente a uma estação de trabalho incorporados com fonte de energia embutida para fornecimento de sinais excitatórios à configuração do eletrodo e medição dos sinais de resposta. A estação de trabalho eletroquímica é conectada a um computador instalado com plataformas de software a fim de interpretar e analisar os dados resultantes do experimento (Figura 7).

Figura 7 - Experimento eletroquímico em sistema trieletródico



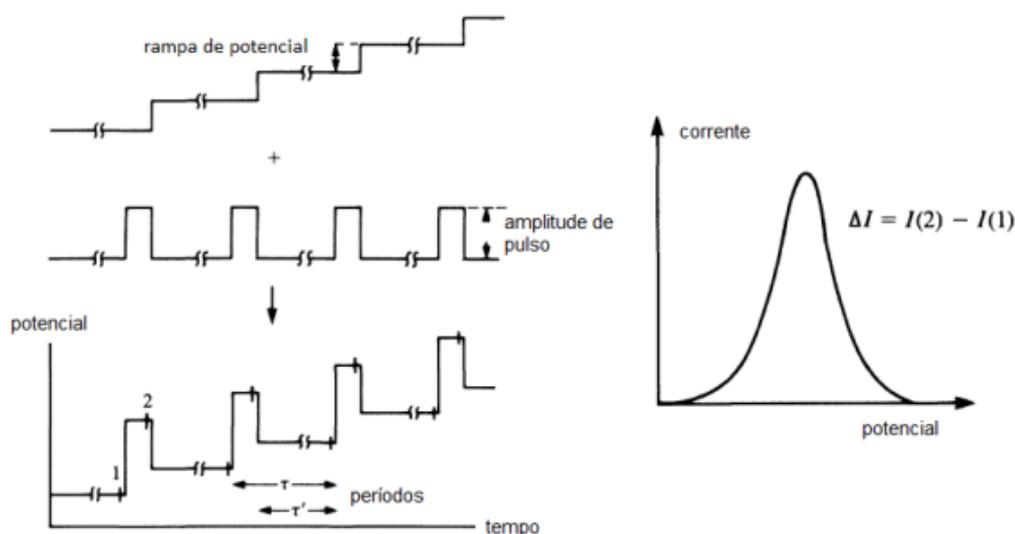
Fonte: Silva (2015).

Dentre as técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica, 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.

2.2.3.1 Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Na VPD, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A maior sensibilidade dessa técnica pode ser atribuída a dois fatores: o aumento da corrente faradaica e a uma diminuição da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, ocorre um aumento na corrente capacitiva e da corrente faradaica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente, assim, selecionando um tempo determinado para se fazer a segunda leitura, faz-se a medida da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva (não faradaica) pode ser desconsiderada. O voltamograma resultante consistiu de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área é diretamente proporcional à concentração do analito (Figura 8). 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 (ALESSI, 2018).

Figura 8 - Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial

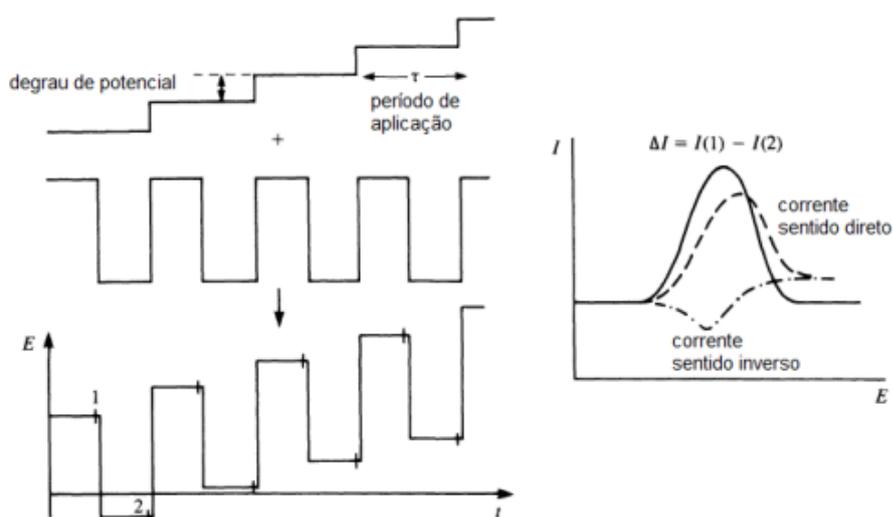


Fonte: Pacheco (2013).

2.2.3.2 Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

A VOQ é uma técnica projetada principalmente para fornecer alta sensibilidade e velocidade da medição analítica. Nesta técnica uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta em uma rampa com formato de escada, é aplicada ao ET. 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 (Figura 9). O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado (MIRCESKI et al., 2020). Como vantagem, pode ser usada para realizar experimentos de maneira mais rápida quando comparada a técnica de pulso diferencial (PACHECO et al., 2013).

Figura 9 - Esquema de funcionamento da voltametria por onda quadrada.

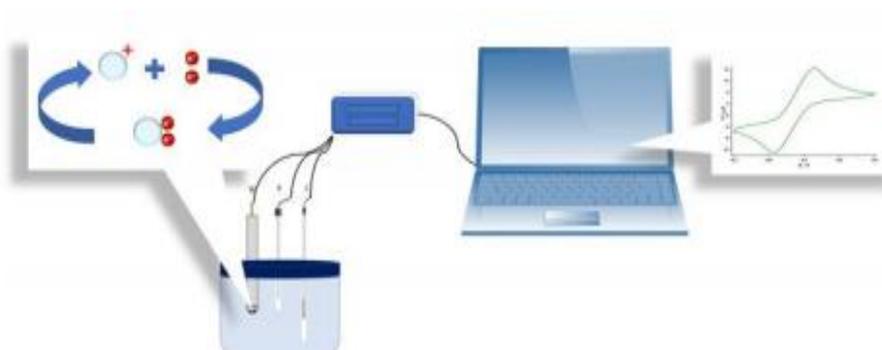


Fonte: Pacheco (2013).

2.2.3.3 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é a técnica mais usualmente escolhida na área de eletroquímica para obtenção de informações relacionadas aos processos. A eficiência desta técnica é decorrente de sua característica de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos eletroquímicos (Figura 10) (BARBOSA et al., 2019).

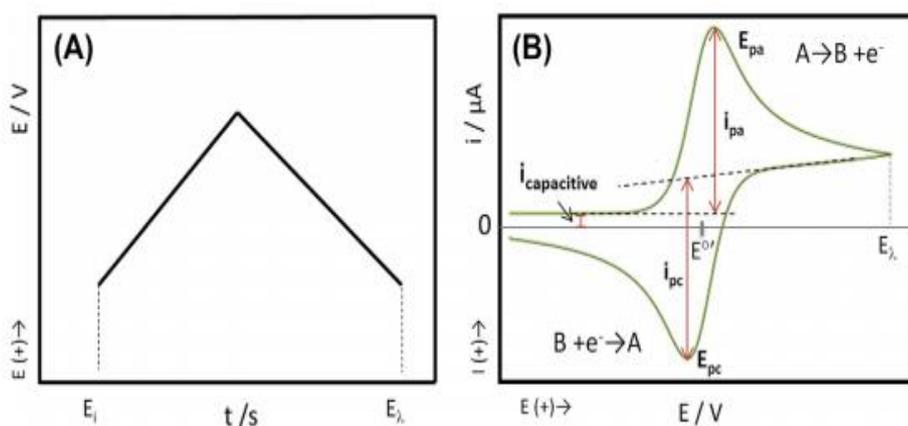
Figura 10 - Representação sistemática da técnica de voltametria cíclica



Fonte: Barbosa et al. (2019).

O processo envolve a aplicação de um potencial de varredura linear E_i ao eletrodo de trabalho até atingir um potencial de comutação E_f . Quando o valor máximo do potencial é atingido, a varredura é invertida, retornando aos valores iniciais, formando o voltamograma. Um parâmetro instrumental chamado taxa scan A controla a escala de tempo no experimento e uma derivada atual do potencial aplicado é registrada (Figura 11). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons. Os parâmetros mais importantes que podem ser derivados de um CV são o potencial de pico (característica da espécie em um meio específico) e a corrente de pico (corrente faradaica relacionados à concentração de analito), que são muito úteis para identificação e determinação de analitos (LOS SANTOS ÁLVAREZ; ABEDUL, 2020).

Figura 11 - (A) Excitação; (B) Resposta do sinal na Voltametria Cíclica.



Fonte: Los Santos Álvarez e Abedul (2020).

2.2.4 Materiais empregados na superfície sensora

A modificação da superfície dos eletrodos é uma importante etapa para obtenção de melhores condições e resolubilidade no desenvolvimento dos imunossensores (BEZZON et al. 2019). Diante disso, os nanomateriais (1 a 100 nm) exibem excelentes propriedades físico-químicas, como a alta relação superfície/volume, excelente biocompatibilidade e boa condutividade, têm atraído grande atenção devido às possíveis aplicações desses materiais no processo de imobilização, garantindo a atividade catalítica das biomoléculas e o aumento do limite de detecção (ARDUINI et al., 2020).

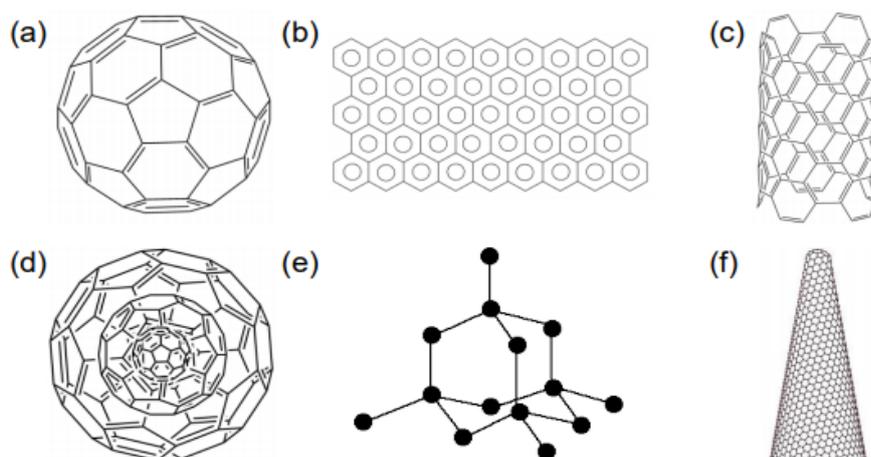
Com base na constituição química, os nanomateriais podem ser principalmente classificados em: nanomateriais à base de alótropos de carbono, constituídos apenas

por átomos de carbono; nanomateriais inorgânicos constituídos por constituintes metálicos ou não metálicos, como ouro (Au), prata (Ag), silício (SiO₂); e, nanomateriais orgânicos compreendendo principalmente nanomateriais poliméricos (PIZARDAS; ALTINTAS, 2019).

A combinação de diferentes nanomateriais reúne as vantagens inerentes a suas individualidades, produzindo um efeito sinérgico, resultando no aprimoramento do sinal e desempenho analítico aprimorado (CARDENAS-BENITEZ et al., 2018). Os nanomateriais exibem propriedades distintas das formas individuais em termos de área superficial e predominância de efeitos quânticos, enquanto o aumento da área superficial desempenha um papel na reatividade química aprimorada do material; os efeitos quânticos resultam da alteração óptica, magnética ou propriedades elétricas (KOEHNE, 2019).

Os nanomateriais baseados em alótropos de carbono atraíram nos últimos anos bastante interesse de pesquisa no campo da biossensibilidade devido à presença de uma grande variedade desse material, como grafite, fulerenos e diamantes, além de outras formas inovadoras, como grafeno, nanohorns e nanotubos (NGUYEN et al., 2019) (Figura 12). Esses nanomateriais possuem uma combinação incomparável de propriedades ópticas, elétricas e mecânicas, gerando sensores miniaturizados com desempenho superior e baixo consumo de energia devido a sua natureza flexível e termicamente estável, com uma relação força/peso superior, bem como alta mobilidade e quantidade de elétrons (MAITI et al. 2019).

Figura 12 - Variedade de alótropos de carbono. (a) Fulereo; (b) Grafeno; (c) Nanotubo de Carbono; (d) Nanoion de carbono; (e) Nanopartículas de Diamante; (f) nanohorn de carbono.



Fonte: Pizardas e Altintas (2019).

Os nanotubos de carbono (NTCs), descobertos em 1991 (LIJIMA, 1991), demonstraram grande potencial e um crescente interesse nos campos de aplicação como nanoeletrônica, biosensoriamento e bioanálise devido a propriedades únicas inerentes a sua configuração, como rigidez, resistência e elasticidade; alto valor de relação de aspecto (relação comprimento/diâmetro); altas temperaturas térmicas e alta condutividade elétrica.

Os NTCs são macromoléculas unidimensionais bem ordenadas, podem ser classificados de acordo com o número de camadas laminadas em duas categorias: nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs). Os SWCNTs têm uma nanoestrutura cilíndrica formado por uma única folha de grafeno enrolada em um tubo com diâmetros entre 1 a 3 nm e um comprimento de poucos micrômetros considerando que os MWCNTs, compostos de folhas de grafeno multi-aninhados, têm um diâmetro de 5 a 25 nm e um comprimento em torno de 10 μm . Os NTCs possuem ainda, classificações quanto sua natureza: metálica ou semicondutora; a quiralidade tem efeito significativo nas propriedades do nanomaterial. Uma única camada de grafeno pode ser enrolada de diferentes formas, possibilitando a classificação dos NTC em: zigzag, poltrona e quiral, dependendo do número de vetores unitários na estrutura cristalina do grafeno ao longo de suas direções (NEGRI et al., 2020).

Estudos atuais demonstram uma excelente combinação da morfologia de nanofios, biocompatibilidade e propriedades eletrônicas que tornam os CNTs uma plataforma ideal para aplicações no biosensoriamento. Especificamente, a combinação entre as propriedades intrínsecas dos NTCs e a função de ancoragem para a imobilização de biomoléculas em sua superfície torna os nanotubos um dos materiais mais adequados para a transdução de sinais associados ao reconhecimento de diversos analitos, metabólitos ou biomarcadores de doenças. Além disso, a capacidade dos NTCs de imobilizar uma grande quantidade de diferentes tipos de biomoléculas e a correlação com o procedimento de funcionalização realizado sugere o uso de NTCs como plataforma de imobilização para o desenvolvimento de biosensores (DI PIETRANTONIO; CANNATÀ; BENETTI, 2019).

A transdução eletroquímica é provavelmente a técnica mais aplicada para o desenvolvimento de biosensores com base na combinação de NTCs e são baseadas em interações biológicas (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2018). Devido às suas propriedades hidrofóbicas, os NTCs apresentam baixa solubilidade aquosa, limitando,

portanto, suas aplicações biomédicas. No entanto, são realizadas a modificação química com grupos hidroxila, carboxila ou amino através de reações covalentes ou não-covalentes pelas quais aumentam a solubilidade aquosa levando a maior biocompatibilidade, minimizando danos estruturais e perturbação das propriedades intrínsecas do nanomaterial (CHOW; GU; XU, 2020).

Os polímeros condutores (PCs) surgiram como um dos materiais mais promissores em muitas aplicações biossensoriais, devido a sua biocompatibilidade e à capacidade elétrica facilmente modificada com o uso de agentes apropriados, pelos quais podem converter as informações bioquímicas em sinais elétricos (SANDHYARANI, 2019). Além disso, os PCs possuem vários grupos funcionais, que fornecem carga enzimática máxima através da interação entre as moléculas enzimáticas e os grupos funcionais dos polímeros (EL-SAID et al., 2020).

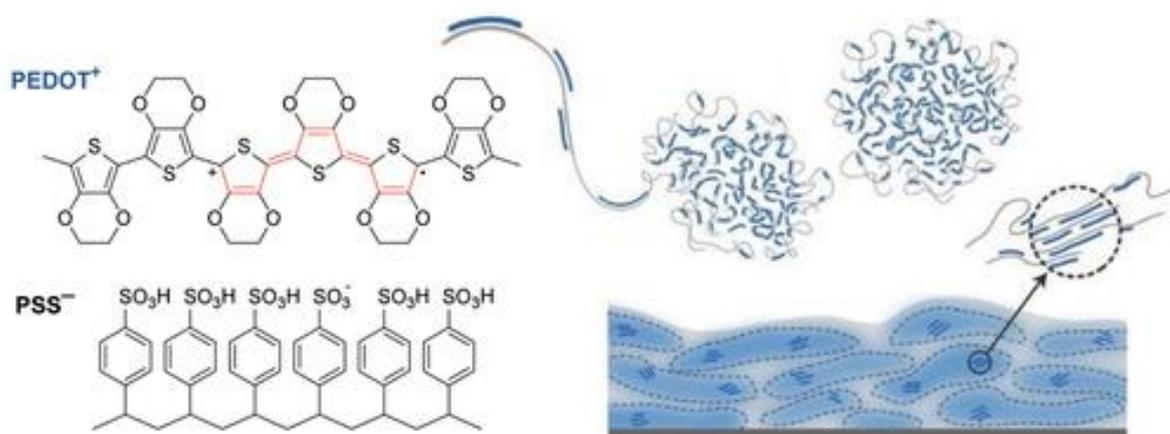
Devido a suas propriedades condutoras, seu uso em aplicações cardiovasculares vem sendo gradativamente utilizado, em particular, na fabricação de biossensores para monitorar o diagnóstico e prognóstico de DCVs (MAZIUKIEWICZ et al., 2020). A modificação superficial de PCs com moléculas biologicamente ativas (a exemplo, das proteínas, peptídeos ou polissacarídeos) foi amplamente realizada usando vários métodos, como quimisorção, ligação ligante-receptor, ligação covalente química e dopagem ou polimerização eletroquímica que podem ser usadas para projetar e fabricar biossensores para fins biologicamente relevantes, como desenvolvimento de diagnóstico no ponto de atendimento (*point-of-care*) (SHANDILYA et al. 2019).

Dentre todos os condutores orgânicos, o poli (3,4-etilenodioxitiofeno) -poli (4-estirenosulfonato) (PEDOT:PSS) é o mais promissor devido à sua alta condutividade, fácil processamento e disponibilidade comercial (AHUJ; MIR; KUMAR; RAJESH, 2018). O PEDOT foi desenvolvido como uma alternativa ao politiofeno para reduzir os acoplamentos $\alpha - \beta$ e $\beta - \beta$ durante a sua polimerização oxidativa. Devido à substituição das posições 3 e 4 do tiofeno, o PEDOT é resistente à degradação pelo oxigênio e pela água. Devido a sua pouca solubilidade, sua conjugação ao PSS tornou-se necessária, levando ao desenvolvimento do PEDOT:PSS, um complexo de polieletrólito composto por PEDOT com carga positiva e dopada com p, e PSS com carga negativa e solúvel em água (KURALAY et al. 2019).

O PEDOT: PSS tem uma estrutura complexa devido à associação íntima de dois polieletrólitos. Possui pequenos segmentos de PEDOT em contato próximo com

agrupamentos de PSS (Figura 13). Esses feixes formam um colóide de partículas de gel na água. A densidade do PEDOT é maior no núcleo das partículas, enquanto a densidade do PSS hidrofílico é a maior na periferia. A morfologia dos filmes e, portanto, a condutividade, é amplamente influenciada pelo método de processamento e quaisquer outros aditivos (geralmente chamados de "dopantes secundários") incluídos na receita para aumentar a condutividade (ZAMANI et al. 2019). Estudos apontam condutividades de até 4380 S cm^{-1} para PEDOT: PSS tratadas com ácido sulfúrico, em comparação com $<10 \text{ S cm}^{-1}$ sem nenhum dopante secundário (KAYSER; LIPOMI, 2019).

Figura 13 - Estrutura química de PEDOT: PSS, sua formação de partículas de gel coloidal quando dispersas em água e microestrutura dos filmes resultantes com domínios ricos em PSS (cinza) e domínios ricos em PEDOT: PSS (azul).



Fonte: Kayser e Lipomi (2019).

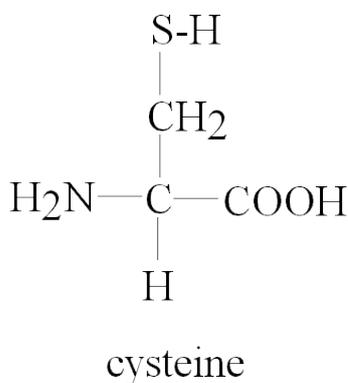
Quando usado em um ambiente biológico, o PEDOT: PSS oferece diversas vantagens sobre materiais inorgânicos, como suavidade, pela qual reduz a incompatibilidade mecânica com os tecidos biológicos; impedância mais baixa e uma maior capacidade de injeção de carga que os metais; além disso, pode ser quimicamente sintonizado para modular as propriedades mecânicas e eletrônicas ou para permitir a fixação covalente de biomoléculas (KIM et al., 2018).

A identificação de novos modificadores incorporados a polímeros condutores, que ofereçam vantagens eletrocatalíticas e modificações estruturais constitui um desafio importante no que diz respeito a funcionalidade e/ou integração a outras substâncias. Muitas abordagens relacionadas aos processos eletroquímicos foram estudadas para melhoria de controle da condutividade, morfologia e espessura dos

compósitos. O objetivo da preparação de substâncias compostas é revelar inúmeras novas propriedades que não são observadas em seus constituintes. Portanto, é importante utilizar uma técnica sinérgica para criar substâncias compostas (ALQARNI et al., 2020).

A Cys, um pequeno aminoácido contendo tiol, contém carboxil, amino e tiol com os respectivos valores de pKa de 1,71, 8,33 e 10,78 (Figura 14) (HAGER; BROLO, 2003) é considerado perfeito em produtos bioquímicos e pesquisa de imunossensores eletroquímicos por permitirem a exposição de grupamento amina para imobilização de anticorpos (ARYAL et al., 2005).

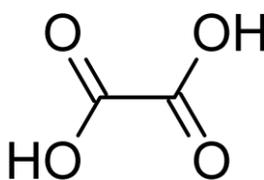
Figura 14 - Configuração estrutural da molécula de L-Cisteína.



Fonte: Pavlin (2019)

Outro exemplo que atua como agente funcionalizante, é o ácido oxálico (nome IUPAC: ácido etanodióico, fórmula $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) é um ácido dicarboxílico com estrutura (HOOC) - (COOH) (Figura 15)), comumente utilizado como reagente analítico, consiste em um ácido orgânico saturado, de cadeia normal e relativamente forte, devido a união de dois grupos carboxila. Seu uso, dentre outros, condiciona meios à exposição de grupamentos carboxilas em filmes condutores eletroquímicos (COLMENERO, 2019).

Figura 15 - Configuração estrutural do ácido oxálico.



Fonte: Colmenero (2019)

3 OBJETIVO

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

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo do estado da arte para detecção do H-FABP, observando os avanços obtidos até presente data;
- Desenvolver uma plataforma sensora empregando eletrodo de carbono vítreo modificado com Nanotubo de Carbono Carboxilado e filme de PEDOT:PSS associada a L-Cisteína;
- Otimizar os parâmetros experimentais, tais como velocidade de varredura, concentrações e estudos de estabilidade;
- Imobilizar os anticorpos anti-H-FABP sobre a plataforma sensora;
- Caracterizar as etapas de formação de filme e imobilização de biomoléculas por técnicas eletroquímicas;
- Estabelecer uma curva de resposta analítica do imunossensor para determinação do H-FABP, empregando a técnica de voltametria cíclica.

4 RESULTADOS

O resultado desta 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 ELETROQUÍMICO DE NANOHÍBRIDO POLIMÉRICO PARA DETECÇÃO DO H-FABP, UM MARCADOR PRECOCE DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Liandra R.P.C. Coutinho^(a), Washington A.C. Coutinho Filho^(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), representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, apresentando taxa crescente de incidência e mortalidade. Devido a sua relevância e magnitude, métodos analíticos de uso *point-of-care* vem ganhando destaque a partir do desenvolvimento de imunossensores eficientes, rápidos e práticos. Aqui, um imunossensor eletroquímico foi desenvolvido para detecção do H-FABP, recentemente apontado como um importante marcador da isquemia cardíaca. Para construção da plataforma sensora, eletrodos de carbono vítreo foram modificados através do uso de nanotubos de carbono carboxilados e eletrossíntese do polímero condutor PEDOT:PSS, associado ao aminoácido L-Cisteína (NTC/PEDOT:PSS@Cys). Após eletrossíntese, o eletrodo foi funcionalizado com grupamento carboxílicos adicionando-se ácido oxálico à plataforma sensora. Em seguida, uma mistura de EDA, EDC/NHS e anti-H-FABP foi adicionada para

exposição de grupamentos aminas facilitando as ligações amidas dos anticorpos à plataforma sensora,. Após imobilização dos anticorpos, os sítios ativos não-reativos do filme foram bloqueados com uma solução dupla de glicina (100mM) em pH 4,0 e pH 8,0. A caracterização do sensor foi realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica. O filme de NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ác.Oxálico apresentou boa estabilidade quando submetido a sucessivas leituras voltamétricas, não existindo deslocamento significativo dos picos (CV% Ipa e Ipc aproximadamente 0,5% e 0,2%, respectivamente). A resposta analítica em amostras de soro enriquecido foi obtida por voltametria cíclica. O imunossensor exibiu uma faixa linear de 5,0 a 17,5 ng/mL, limite de detecção em 5,6 ng/mL e limite de reação (*Cut-off*) em 9,62 ng/ml. Apesar de outras plataformas na literatura apresentarem limites de detecção mais baixos, esta mostrou excelente estabilidade com o uso de filmes poliméricos utilizando um composto inovador, o PEDOT:PSS.

Palavras-chave: Imunossensor. Nanotubos de Carbono. H-FABP. Infarto Agudo do Miocárdio

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são alterações que afetam as funções responsáveis por carrear oxigênio e nutrir os tecidos celulares para o seu pleno desempenho (COSTA, et al. 2019). Destas, a principal etiologia é o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) que constitui um grande desafio terapêutico, com impacto considerável na morbimortalidade e incidência anual estimada de 5,0-8,0%, altas taxas de hospitalização e elevados custos à saúde pública mundial (OMS, 2017; BRAILE-STERNIERI, et al. 2018),

A abordagem emergencial ao paciente com suspeita de IAM, deve ser rápida e direcionada com o objetivo de facilitar o tratamento imediato e reduzir possíveis danos permanentes ao indivíduo (MARTINEZ et al, 2019); todavia, desafios inerentes à confirmação diagnóstica da doença é evidenciada devido a sua similaridade com outras patologias cardiovasculares.

Atualmente, quando na presença de quadro clínico sugestivo, o paciente com suspeita de IAM realiza o exame de eletrocardiograma (ECG) e por meio dos traçados sugestivos pode-se determinar a probabilidade da ocorrência do evento isquêmico. Entretanto o ECG por possuir baixa sensibilidade (~50%) não é considerado um

exame de confirmação diagnóstica, necessitando da utilização de novos métodos ou abordagens diferenciais (HARROGATE et al., 2019). O emprego de biomarcadores cardíacos para auxílio diagnóstico do IAM é atualmente considerada uma boa estratégia devido à eficácia de diferenciação na indicação de processos patogênicos mediados pela liberação de componentes intracelulares na corrente sanguínea em concentrações mais elevadas que as usuais, especificidade e sensibilidade para detectar lesões miocárdicas, reprodutibilidade, precisão e limites discriminatórios para distinguir entre níveis patológicos e fisiológicos. (BENJAMIN; MUNTNER; BITTENCOURT, 2019). Estudos mostram que pelo menos 4 a 8% dos pacientes com IAM em evolução são erroneamente liberados das emergências sem a análise de marcador em série que possibilitaria um diagnóstico adequado, resultando em uma maior taxa de mortalidade a curto prazo (ENGEL; ROCKSON, 2020).

Os altos níveis de biomarcadores cardíacos são induzidos pelo processo de ativação por liberação desses componentes estruturais rapidamente após dano nos cardiomiócitos e consequente morte celular. Atualmente, os importantes biomarcadores cardíacos para o diagnóstico de IAM são troponina cardíaca I (cTnI) e T (cTnT), mioglobina (Mb), creatina quinase-MB (CK-MB) e, mais recentemente, a proteína de ligação a ácidos graxos do coração (H-FABP) (YOUSEFI et al., 2019).

O H-FABP é um tipo de proteína intracardíaca, extremamente sensível nas primeiras horas após a lesão do miocárdio e durante a reperfusão, que desempenha um papel essencial no metabolismo de ácidos graxos nos cardiomiócitos (YE et al., 2018). Clinicamente, a elevação do H-FABP na circulação indica dano histórico ou contínuo aos miócitos e é um marcador útil para monitoramento e gerenciamento da terapia em diversos problemas cardiovasculares (HO et al., 2019). Além disso, podem ser cruciais na previsão de risco futuro de eventos cardíacos, e ser útil para monitorar os danos do miocárdio induzidos pela ablação por radiofrequência de arritmias e angioplastia coronariana (DELLAS, et al. 2018).

Sabe-se, hoje, que a cTnT supera ligeiramente o H-FABP, uma vez que após as 4 horas do início dos sintomas a sensibilidade das moléculas se equiparam, todavia, a combinação da elevação de ambos marcadores proporciona uma melhora significativa na sensibilidade, além de melhorar o valor preditivo negativo, a relação de verossimilhança negativa e a relação de risco, resultando em um ótimo desempenho (OLIVEIRA; SANTOS; HOFFMANN, 2018). Já a especificidade da H-FABP é significativamente menor do que cTnT, isso devido à elevação da H-FABP em

outras condições, além do alto nível das FABPs na musculatura esquelética, que estruturalmente é igual à cardíaca, podendo resultar em valores alterados deste marcador (NSABIAMA, et al. 2019). O conteúdo miocárdico da H-FABP (0,57 mg = g de peso úmido) é quatro a cinco vezes menor que o da MB (2,7 mg = g de peso úmido), mas a concentração de referência plasmática do H-FABP é 19 vezes maior que o da MB, isso significa que, após lesão, o gradiente plasmático é quase cinco vezes maior para H-FABP do que para MB, fazendo com que o H-FABP no plasma suba acima sua concentração de referência após o início do IAM, permitindo um diagnóstico precoce (WAFÁ et al., 2018; WILLEMSEN et al. 2019).

Visto que o uso do H-FABP como ferramenta diagnóstica no IAM é uma aplicação recente, atualmente os ensaios comerciais existentes no mercado se baseiam em métodos clássicos, por meio do reconhecimento antígeno-anticorpo (AG-AC), como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de fluorescência ou detecção radioquímica (GRABOWSKA et al., 2018); e, apesar do abrangente desenvolvimento de tais métodos, suas principais desvantagens referem-se aos longos períodos de análise e problemas de reatividade cruzada, sendo assim considerados pouco sensíveis e de uso limitado. Tais desvantagens podem ser superadas pelo uso de dispositivos analíticos portáteis, uma vez que esses têm grande potencial para minimizar o tempo entre o diagnóstico e o tratamento apropriado.

Os dispositivos biossensores eletroquímicos são os principais candidatos ao desenvolvimento de testes de diagnóstico baratos, descartáveis e sensíveis, por possuírem boa resposta, possibilidade de operação em temperatura ambiente e fabricação com tecnologias de alto rendimento (DU et al., 2020). São configurados a partir de um componente biológico ligado a um transdutor capaz de converter o sinal gerado pela interação biológica entre biomoléculas em um sinal mensurável (WANG et al., 2020). Quando o reconhecimento da molécula de interesse é dado pela formação de imunocomplexos, este biossensor recebe o nome de imunossensor que resultam em respostas altamente seletivas e específicas (OLIVEIRA; SILVA; COELHO; CORREIA, 2019).

A possibilidade do desenvolvimento de dispositivos à beira do leito, chamados de "POCT", do inglês "*point-of-care testing*", revela vantagens relacionados ao menor tempo de resposta para o diagnóstico (CECCHETTO et al., 2020), realizando a

quantificação baseada na reação de interação AC-AG como elemento de reconhecimento em faixas de concentrações muito baixas (imuno-POCT's) (VASANTHAM et al., 2020). Alguns dos desafios no desenvolvimento de imuno-POCT's práticos, rápidos e efetivamente competitivos a uma tecnologia “à beira do leito” consiste em concomitantemente: a) alcançar baixos limites de detecção; b) promover uma rápida resposta, ou seja, gerar um sinal elétrico imediato à interação AG-AC, dispensando o uso de marcadores conjugados que se rendem a oxidar ou reduzir espécies eletroativas para geração do sinal elétrico; c) alcançar boa especificidade; d) fazer uso de tecnologias transdutoras facilmente portabilizadas e aliadas a um baixo custo, e e) alcançar boa reprodutibilidade (PARLAK et al., 2020; TSUTSUI, et al. 2020).

Outro aspecto bastante importante na construção de um imuno-POCT, se refere a introdução de nanomateriais que permitem o aumento da área de imobilização da molécula, a promoção da reação eletroquímica e o aumento de sinal do bioreconhecimento, sendo a sensibilidade e alta condutividade por área (alta razão de aspecto) os maiores atributos que o uso de nanomateriais podem oferecer na construção de um imuno-POCT (KOUR et al., 2020). A conjugação de nanotubos de carbono (NTC) à polímeros condutores (PCs), como os derivados do tiofeno (VILLEMIN et al., 2019), tem sido bastante utilizada devido propriedades específicas, como estabilidade, processabilidade e fácil preparação, ainda permitem controlar as propriedades das superfícies eletródicas e funcionalização das plataformas. Entre PCs derivados de tiofeno, o poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) (PEDOT:PSS) apresenta como vantagens o fornecimento dos estados dopados altamente condutores e especialmente estáveis, uma gama de propriedades ópticas com intervalos de banda eletrônicos variando em todo o espectro visível e propriedades redox aprimoradas, tornando-os úteis para vários dispositivos eletroquímicos (PORCU et al., 2020; CAI et al., 2020). Todavia, não apresenta grupos funcionais amino reativos, impossibilitando ser utilizado para imobilização covalente de biomoléculas. Desta forma, o uso da L-Cisteína (Cys), como agente modificadora da estrutura conformacional do filme polimérico, torna-se importante via de ligação molecular por meio da interação com o grupamento amina presente na estrutura (ZHANG et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho descreve uma plataforma na qual foi formada por um filme polimérico condutor de PEDOT:PSS associado à Cys, pela formação de um copolímero, e NTC. 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 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. 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, EUA). O polímero Poli (3,4- etilenodioxítiofeno) - poli (estirenosulfonato) (PEDOT:PSS), a *L-Cysteine* (Cys), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), etilenodiamina 98% puro (EDA) e o ácido oxálico $\geq 99\%$ foram obtidos da Sigma-AldrichTM (St. Louis, EUA). Os nanotubos de carbonos funcionalizados com grupamentos carboxílicos (NTC-COOH), 95% puros, foram obtidos da DropsensTM (Oviedo, Espanha). A glicina foi comprada da Fluka Analytical, o H₂SO₄ e ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) da Química Moderna, e o ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) da Vetec (Brasil). Os demais reagentes utilizados não mencionados foram de grau analítico.

O tampão de fosfato salino (PBS) (0,01 M, pH 7,4) utilizado em todos os experimentos para diluição de amostras e soluções foi preparado por dissolução de 0,2 g de KCl, 8,0 g de NaCl, 0,24 g de KH₂PO₄ e 1,44 g de Na₂HPO₄ em 1000 ml de água pura obtida de unidade de osmose reversa (Human RO 180). O PBS 0,05% Tween (pH 7,4), foi preparado usando 1000ml de PBS e 50 μ l de Tween 20 (Polissorbato) e misturados até perfeita homogeneização (C₅₈H₁₁₄O₂₆) obtidos da Sigma-AldrichTM (St. Louis, EUA).

2.2. Medidas eletroquímicas e equipamentos

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando-se o potenciostato Autolab PGSTAT101 (Eco Chemie, Holanda), controlado pelo software Nova 2.1.3 aquisição e processamento de dados. Todas as medidas eletroquímicas foram obtidas a partir de um sistema convencional de três eletrodos, composto de eletrodo de carbono vítreo (Glassy Carbon Electrode - GCE) de seção circular de área de 6 mm² 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 5mM de (K₃[Fe (CN)₆])/ (K₄ [Fe(CN)₆]) preparada em 0,1M de KCl.

Para eletrossíntese do filme PEDOT:PSS@Cys sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi utilizada a técnica de voltametria cíclica com velocidade de varredura de 50 mV/s, em janela potencial entre -1,5 a 1,5V, durante 20 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 -0,2V a 0,6V a uma velocidade de varredura de 50 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 PEDOT@Cys

Previamente às etapas de montagem do filme, a superfície do CGE foi submetida a um procedimento de limpeza manual realizado por polimento com pasta de alumina (0.3 μm) em pano limpo e macio, 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 (K₃[Fe(CN)₆])/ (K₄ [Fe(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 etapa de limpeza dos eletrodos, o GCE foi modificado com 1 mg de NTC-COOH disperso em uma solução aquosa de 1mL de dimetilformamida (DMF) a 0,1mM, levada previamente a um banho ultrassônico por 2 horas. Os NTCs-COOH foram depositados pela técnica “*dropcasting*”, utilizando-se 3μl da solução sobre a superfície eletródica e em seguida levado a estufa a 50 °C para secagem total da

superfície. A modificação com NTCs-COOH, seguida por secagem em estufa foi repetida por três vezes consecutivas até total cobertura do eletrodo.

Em seguida, o GCE/NTC foi imerso em uma célula eletroquímica contendo solução de 374,45 mM de PEDOT:PSS e 3,34 mM de Cys em 2M de tampão fosfato (pH 4,0), e submetido à eletrossíntese pela técnica de voltametria cíclica p com velocidade de varredura de 50 mV/s, em janela potencial entre -1,5 a 1,5V, durante 20 ciclos. Após o processo de eletrossíntese, uma solução de ácido oxálico (10%) foi pipetada sobre a superfície eletródica e deixado sob reação por 30 minutos em temperatura ambiente, na intenção funcionalização da superfície sensora com grupamento carboxílico (COOH).

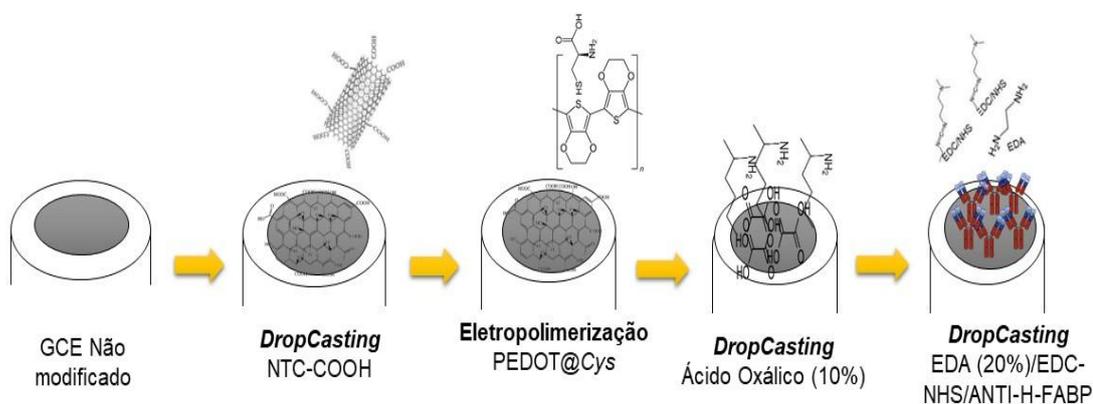
2.4. Imobilização do anti-H-FABP e bloqueio de ligações não específicas

Após formação do filme nanoestruturado e funcionalizado com grupamento carboxílico, iniciou-se o processo de imobilização dos anticorpos na plataforma sensora. Para isso, uma mistura de EDA (20%), 80mM de EDC e 100mM de NHS [1:1], com 50 µg/ml de anti-H-FABP foi deixada em repouso por 40 minutos com temperatura +2 °C a 8°C (geladeira). Em seguida, após tempo de reação, o composto contendo os anticorpos foi depositado sobre a superfície de eletrodo e então deixado “overnight”. A próxima etapa do processo, seguiu por meio de lavagem exaustiva do eletrodo, a fim de remover o excesso de anticorpos não ligados. Em seguida, o eletrodo passou pela etapa de bloqueio duplo com glicina (100mM), em meio ácido e básico de solução PBS, pH 4,0 e pH 8,0 respectivamente, sendo posteriormente incubados por 80 minutos em cada meio. Após cada reação, os eletrodos foram lavados resultando em sucessivas camadas reativas (GCE/NTC-COOH/PEDOT:PSS@CYS/Ác.Ox./Anti-H-FABP/Glicina).

2.5. Obtenção de respostas analíticas

O imunossensor nanohíbrido foi submetido à prova com amostras de H-FABP incubadas durante 30 minutos na concentração de 2,5 ng/ml a cada leitura. Antes da leitura da corrente resultante, a superfície do eletrodo foi lavada exaustivamente com PBS Tween (pH 7,4), a fim de retirar o excesso da amostra não ligada aos anticorpos da plataforma. Um resumo de todas as etapas envolvidas na construção do imunossensor e ensaio de formação do imunocomplexo está esquematizado na Figura 1.

Figura 1. Desenho esquemático da montagem do imunossensor e sistema de eletropolimerização do filme.



Fonte: Elaborado pelo autor

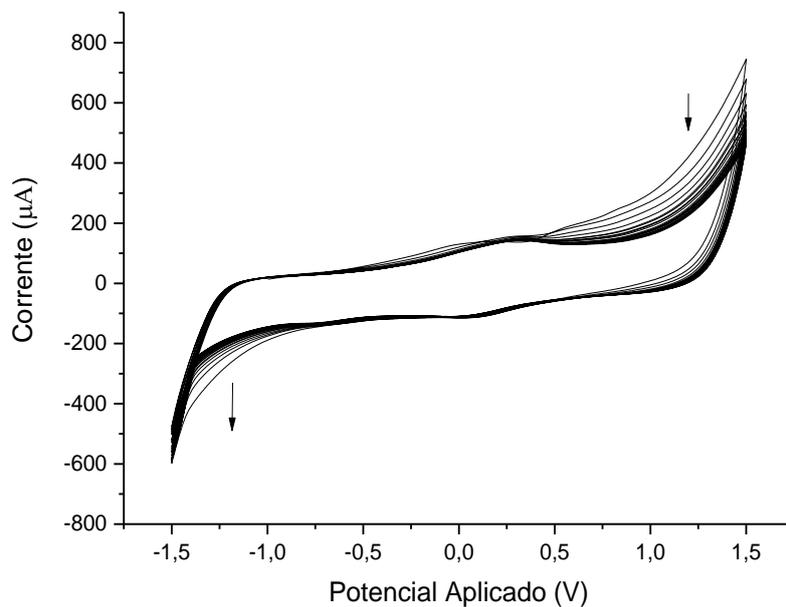
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Eletrossíntese do filme de PEDOT:PSS@Cys

A cinética de formação do filme sintetizado de PEDOT:PSS@Cys foi observada a partir estudos voltamétricos em presença de sonda redox de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$ preparada em 0,1M de KCl (Figura 2).

Os VCs exibiram um perfil eletroquímico típico, mostrando a redução dos potenciais de oxidação na faixa entre 0,5 V à 1,5 V durante as varreduras (50 mV/s). A redução de potencial pode ser atribuída à oxidação dos grupos amino-reativos presentes na Cys expostos durante a síntese, iniciando a cadeia de polimerização sobre a superfície do filme de PEDOT:PSS eletrodepositado. Acredita-se que a ligação da Cys ao filme polimérico é ajudada por uma prévia incubação dos dois reagentes por um período de 40 min antes do procedimento eletroquímico. Observou-se também um aumento progressivo da corrente de redução, resultante da modificação dos derivados do PPS em presença do ânion NH_2 .

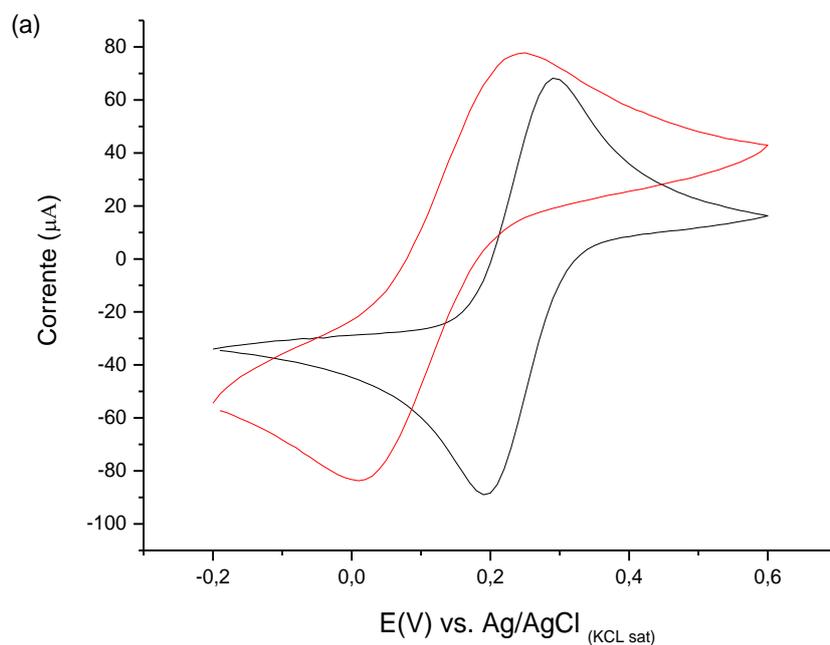
Figura 2. Voltamograma cíclico de eletrodo de GCE em processo de eletropolimerização para obtenção de PEDOT@Cys com 20 ciclos sucessivos na presença de eletrólito suporte de tampão fosfato (pH 4,0).



Fonte: Elaborado pelo autor

A eletrossíntese PEDOT:PSS@Cys sobre a superfície sensora resultou em filmes delgados, a qual foi confirmada por alterações nas amplitudes dos picos redox dos VCs (Figura 3). Foi observado um aumento dos picos redox anódicos e catódicos em 0,2V e - 0,6V, respectivamente, o que caracteriza filme de natureza condutora, e obtenção de um aumento de área do eletrodo modificado de aproximadamente 24,4% em relação ao eletrodo limpo.

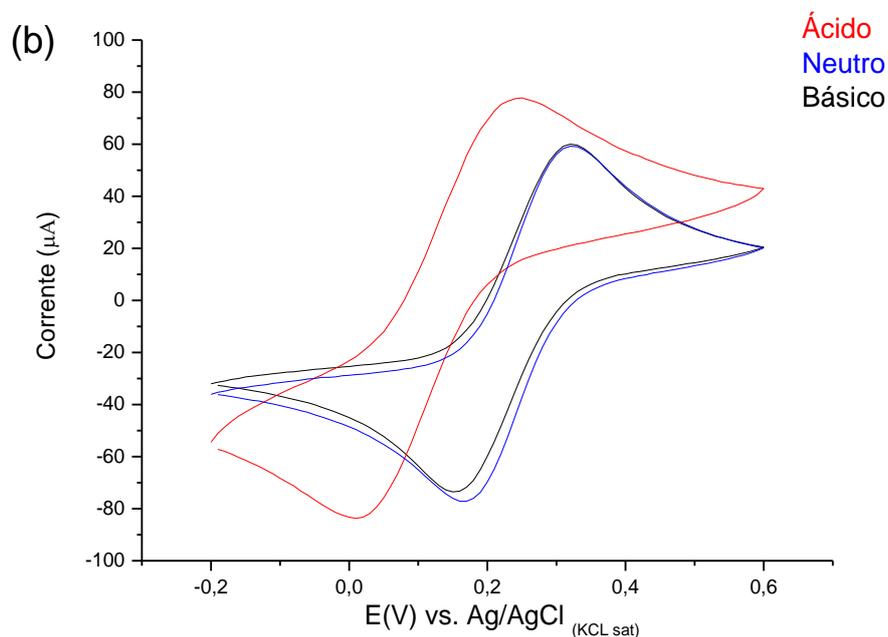
Figura 3. Estudo de pH do filme PEDOT:PSS@Cys. (a) Voltamogramas Cíclicos do GCE limpo (curva em preto) e GCE modificado (curva em vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor

Um dos importantes parâmetros que podem influenciar na performance elétrica de filmes condutores é a natureza do meio em que são eletrossintetizados. Aqui, foram testadas eletrossíntese em diferentes pHs. Para o meio ácido, foi utilizado o Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) a 0,1M e a partir do controle de pH, estabeleceu-se o valor de 4,0 como ótimo. Para análise em meio básico, foi utilizado Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,1M em pH 9,0. É previamente conhecido que o PEDOT:PSS sintetizado em meios mais ácidos resultam em polímeros mais condutores. Ratificando esse achado, Bießmann et al. (2018) investigaram a origem da melhoria da condutividade dos filmes finos PEDOT:PSS em tratamentos com diferentes ácidos. Na Figura 4 são exibidos os perfis eletroquímicos do filme em diferentes pHs, mostrando que o filme de PEDOT:PSS@Cys sintetizado em pH ácido resultou em maior área eletroativa, demonstrando melhor condutividade. Desta forma, os experimentos remanescentes de síntese foram realizados em presença de 0,1M de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), em pH ajustado para 4,0.

Figura 4. Estudo de pH do filme PEDOT:PSS@Cys. (b) Voltamogramas Cíclicos das modificações realizadas em pHs ácido, básico e neutro.

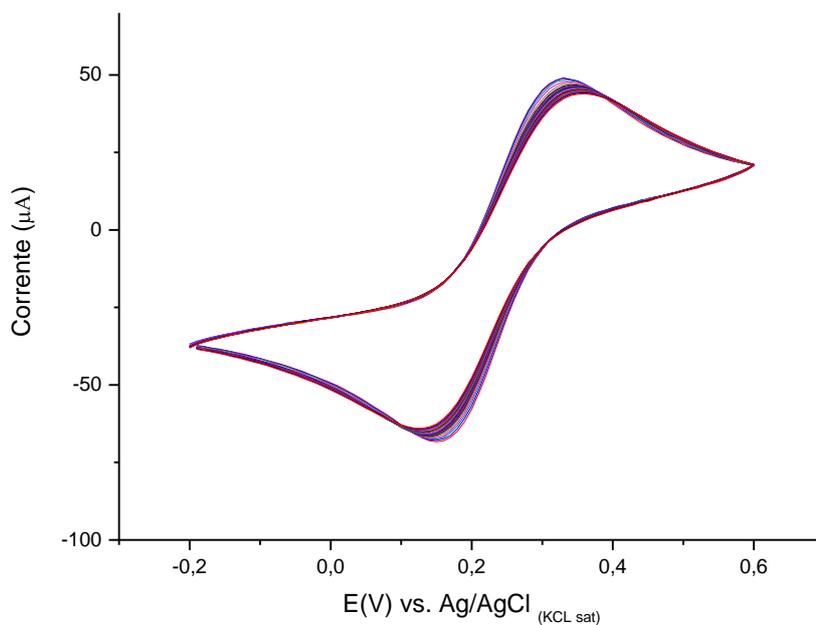


Fonte: Elaborado pelo autor

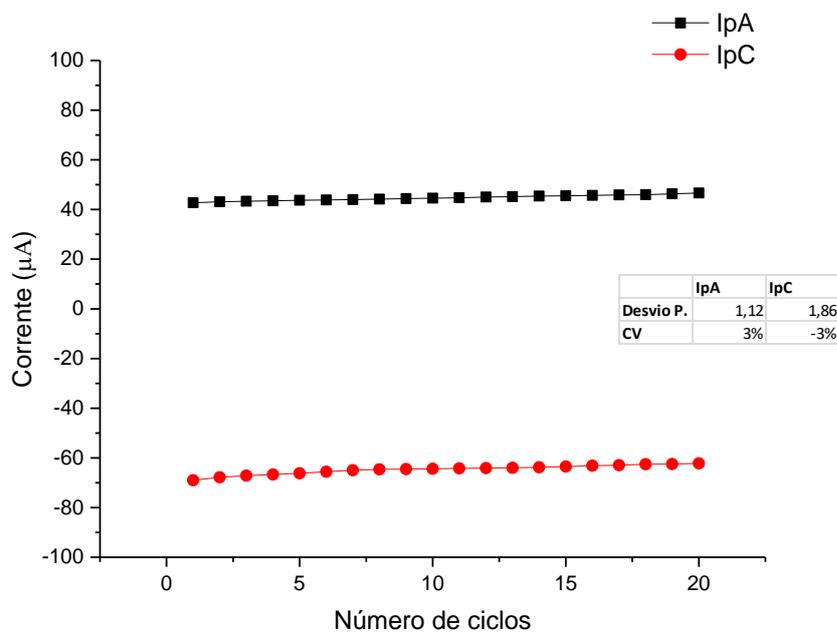
A eletrossíntese do compósito PEDOT:PSS@Cys renderam filmes firmemente aderidos à superfície sensora. Esta afirmação foi apoiada considerando-se ensaios de VCs sucessivos, no qual os eletrodos modificados foram submetidos a uma velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s (Figura 5(a)). Os coeficientes de variação (CVs) dos picos de correntes redox dos VCs (Figura 5(b)) foram calculados, sendo obtidos valores similares para I_{pA} e I_{pC} de aproximadamente 3%. Disto, conclui-se que o compósito eletrossintetizado foi eletroquimicamente estável (XU et al., 2018).

Figura 5. Estudo de estabilidade eletroquímica do PEDOT:PSS@Cys, na presença de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$ à 0,005 M. (a) Voltamograma Cíclico das respostas de I_{pa} e I_{pc} ; (b) Valores de I_{pa} e I_{pc} obtidos nos sucessivos ciclos.

a)



b)



Fonte: Elaborado pelo autor

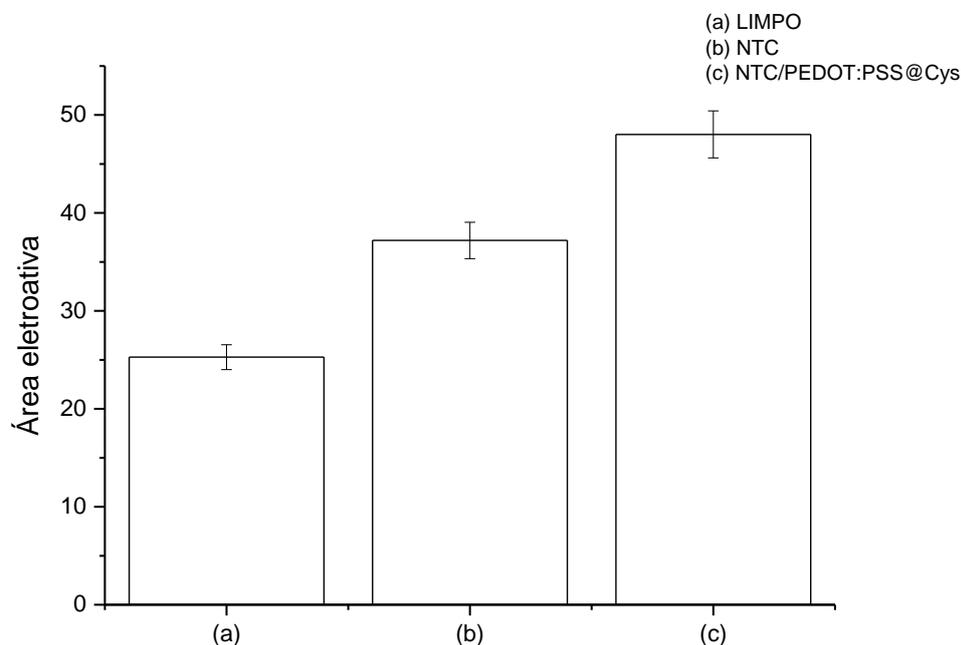
3.2. Montagem da superfície nanoestruturada

A utilização de Nanotubos de Carbono (NTC) em plataformas sensoras melhoram as 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 carboxilado foi confirmado pelo expressivo aumento da área eletroativa quando comparado ao eletrodo não modificado, com base na equação de Randles-Sevick, equação 1.

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

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 ” consiste na concentração da molécula sonda em solução ($mol cm^{-3}$) (RETTTER et al., 2003). De acordo com Equação 1, constatou-se um aumento médio de 87,5%, para três replicatas. Da mesma forma, observou-se um aumento de filmes de NTC/PEDOT@Cys resultando em um aumento da área eletroativa média, de (b) com 47,17% e (c) com 90,00%, em relação ao eletrodo não modificado (Figura 6) 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 6: Diagrama de barras indicando áreas eletroativas normatizadas em relação ao eletrodo limpo nos respectivos passos de montagem: a) GCE limpo, (b) GCE/NTC (c) GCE/NTC/PEDOT:PSS@Cys.



Fonte: Elaborado pelo autor

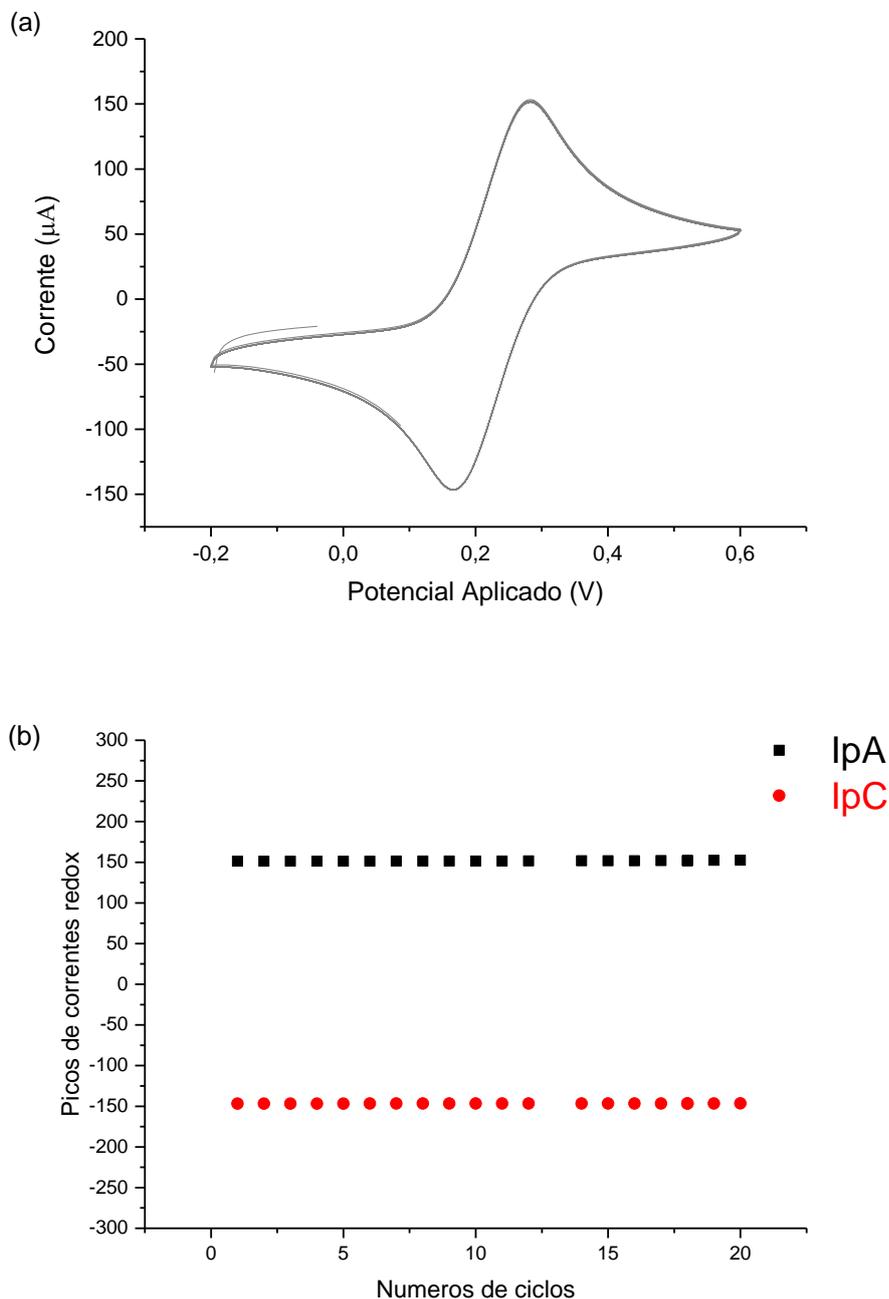
A forma de ligação das nanoestruturas de carbono às superfícies sensoras podem afetar as respostas analíticas, uma vez que podem ser lixiviados durante as medidas. Polímeros têm sido utilizados para ancorar NTCs, dentre eles, aqueles que apresentam em suas estruturas grupos funcionais reativos às nanoestruturas, tais como $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$ e $-\text{NH}_2$ (WANG et al., 2007; DOHNO; STEMP; BARTON, 2003). Acredita-se que os NTC foram aderidos ao filme de PEDOT:PSS@Cys por interações π - π que ocorrem com empilhamento dos anéis aromáticos presentes nas suas paredes laterais e anéis aromáticos, bem como por ligações não covalentes através de interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos com os átomos de enxofre presentes no PEDOT e na Cisteína (FISCHER et al., 2017). Por outro lado, os grupos sulfônicos do PSS, também atuaram na interação dos grupos amino do PEDOT facilitando uma outra interação eletrostática com os NTCs (GUIVER; ROBERTSON; FOLEY, 1995).

3.3. Imobilização de Anticorpos

Para imobilização dos anticorpos Anti-H-FABP utilizou-se da estratégia de ligações amidas. Foi usado um agente bifuncional, o EDA, que funcionou como um extensor à plataforma sensora. Este por ser um composto di-amino formou ligações amida tanto pelos grupos carboxílicos (GCX) presentes na porção Fc dos anticorpos, quanto dos grupos GCX presentes no filme ácido oxálico, obtido por drop-casting sobre o filme de NTC/PEDOT:PSS, gerando-se assim uma maior estabilidade de imobilização dos anticorpos à plataforma sensora. Além disso utilizou-se do composto EDC/NHS. O subproduto EDC é liberado como derivado solúvel da ureia e o NHS é normalmente usado junto com o EDC para criar ésteres mais estáveis que o intermediário o-acilisourea, permitindo o acoplamento da amina ao grupo carboxílico (LAI et al., 2013).

Previamente à imobilização, estudos de estabilidade do nanofilme composto por GCE/NTC/PEDOT:PSS@CYS/Ác.Ox. foram realizados submetendo-se os eletrodos a 20 ciclos consecutivos de voltametria cíclica ($v = 50\text{mV/s}$, janela de potencial entre $-0,2$ a $0,6\text{V}$) (Figura 7). Pode-se observar na Figura 6 um padrão repetitivo 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 Coeficientes de Variação (%CV) calculados para I_{pa} e I_{pc} foram de aproximadamente 0,5% e 0,2%, boa estabilidade atribuídas às fortes ligações entre os componentes do filme NTC/PEDOT:PSS@CYS/Ác.Ox.

Figura 7: Estudo de estabilidade eletroquímica do filme, na presença de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$ à 0,005 M. Respostas de I_{pA} e I_{pC} dos CVs realizados em 20 ciclos sucessivos. (a) VC dos picos I_{pA} e I_{pC} ; (b) Dados em gráfico de pontos dos picos I_{pA} e I_{pC} .

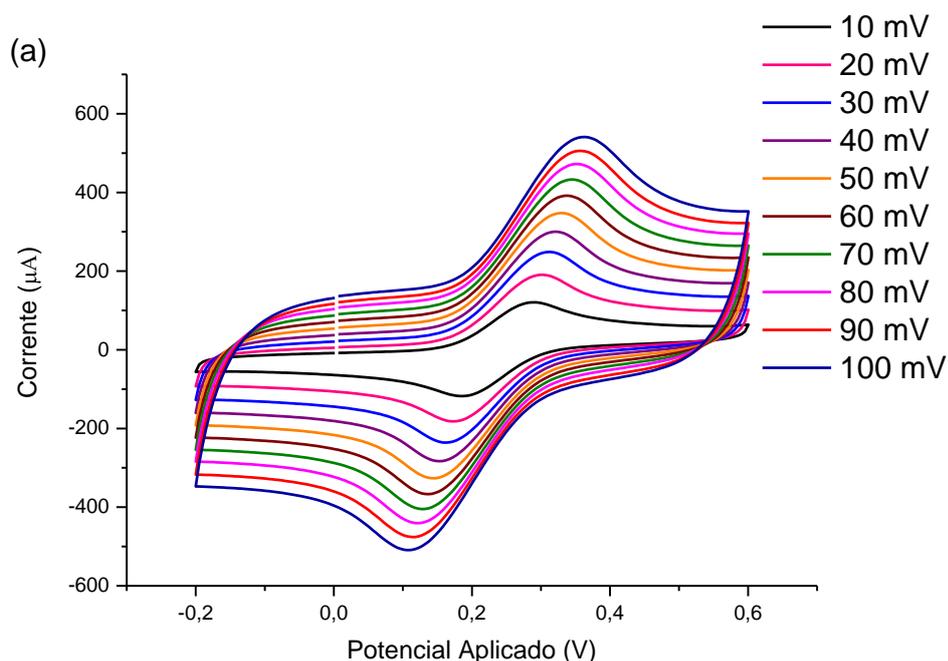


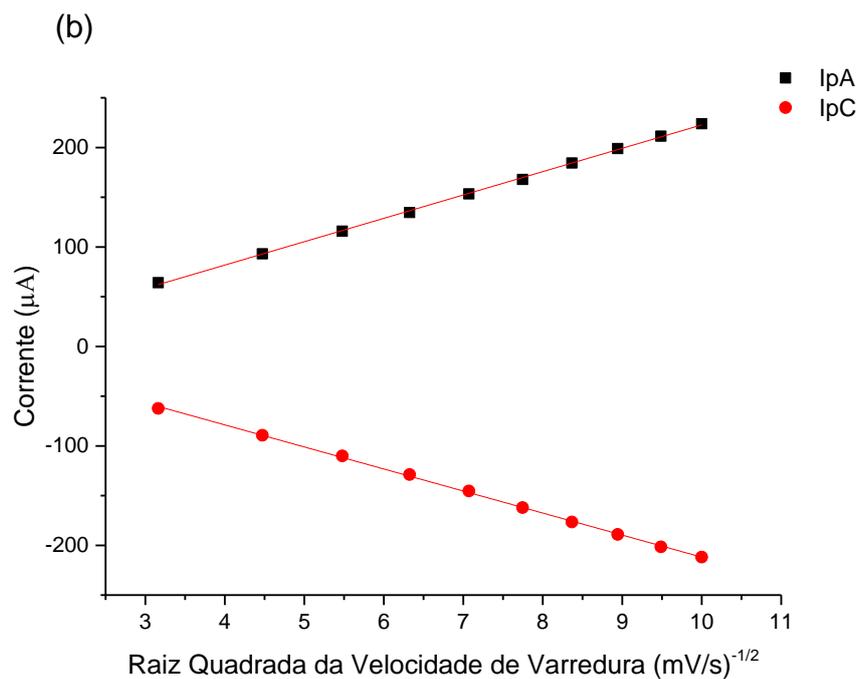
Fonte: Elaborado pelo autor

Estudos de velocidade de varredura foram também realizados com eletrodo modificado por nanocompósito NTC/PEDOT:PSS@CYS/Ác.Ox. na presença de sonda redox variando-se de 10 a 150 mV/s na presença de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$ à 0,005 M na janela potencial -0,2 a 0,6 V (Figura 8). Conforme o aumento

da velocidade de varredura de potencial, foi observado um crescimento proporcional dos picos anódicos e catódicos (I_{pa} e I_{pc} , respectivamente), porém, não linear em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 8 (b)), podendo indagar um perfil de processo adsorptivo ou misto. Após uma análise mais acurada, extraíndo-se o logaritmo da raiz da velocidade de varredura de potencial *versus* logaritmo de correntes de picos redox, indicando um %CV de aproximadamente de 7,8% para I_{pA} e 7,9% para I_{pC} (Figura 9). Tais achados, parecem indicar que há uma possível adsorção de cargas à superfície sensora, provavelmente devido à forte atração entre os íons gerados na reação de óxido-redução dos compostos férricos e os grupos afins do ácido oxálico presente no filme nanoestruturado à base de PEDOT:PSS@Cys.

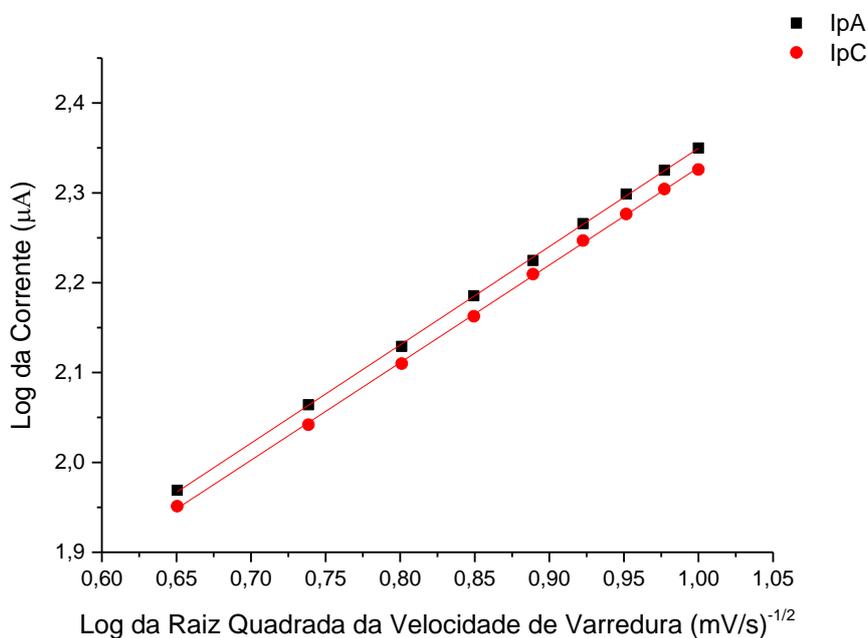
Figura 8: (a) Perfis voltamétricos realizados em NTC/PEDOT:PSS@CYS/Ác.Ox. obtidos sob diferentes velocidades de varredura na presença de 5mM de $(K_3[Fe(CN)_6]) / (K_4[Fe(CN)_6])$. (b) Plot da raiz quadrada da velocidade de varredura vs. picos anódicos e catódicos.





Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9: Plot do log de varredura vs. log da corrente.

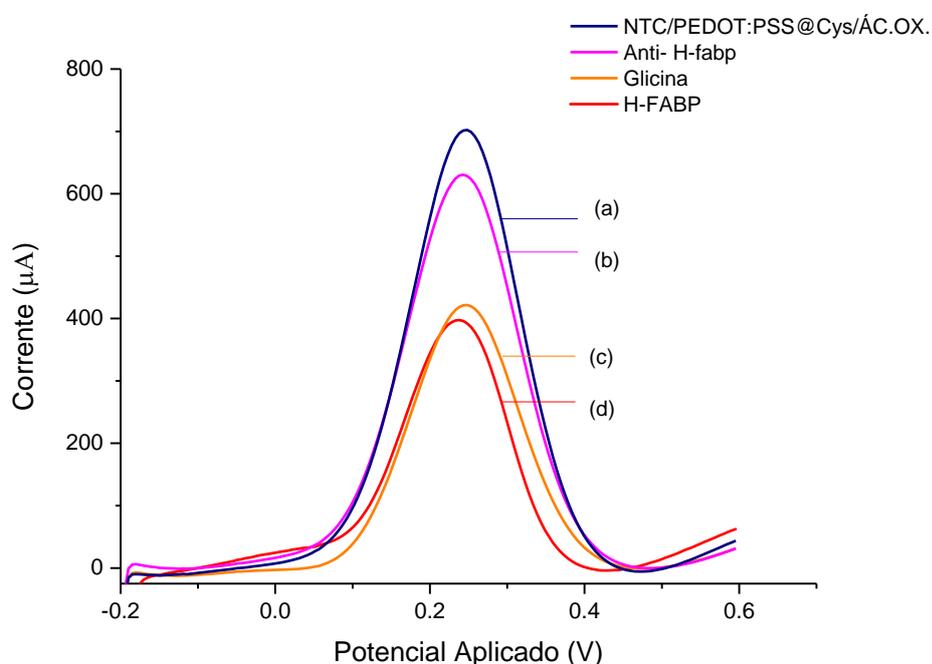


Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a avaliação do desempenho do filme A imobilização dos anticorpos foi confirmada pelos traçados de voltametria de onda quadrada (VOQ), por uma redução nos picos do voltamograma em comparação com o perfil do eletrodo sem a presença do anticorpo anti-HFABP. (Figura 10). A fim de bloquear as ligações não específicas,

foi inserida uma etapa de bloqueio com glicina, que também devido à natureza isolante do filme obtido resultou numa redução dos picos de potencial (GOMES-FILHO et al., 2013). A presença do anticorpo e sua atividade foi também confirmada pela resposta sensora na presença do seu respectivo antígeno H-FABP (2,5 ng/ml).

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 50 mV/s. (a) GCE/NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ác.Ox., (b), (c) GCE/NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ácido Oxálico/ ANTI-H-FABP (d) GCE/NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ácido Oxálico/ ANTI-H-FABP/ Glicina e) GCE/NTC/PEDOT:PSS@Cys/Ácido Oxálico/ ANTI-H-FABP/ Glicina/HFABP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4. 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 enriquecidas com o antígeno H-FABP (Figura 7). O imunossensor exibiu uma faixa de resposta linear de 5,0 a 17,5 ng/mL. A linearidade foi obtida a partir da equação da reta (Equação 2):

A = slope

B = intercept

$$I (\mu\text{A}) = a*[\text{H-FABP}](\text{ng/ml}) + b \quad (2)$$

sendo:

I = corrente (μA)

a = inclinação da curva analítica (sensibilidade)

x = concentração do analito (unidade/ml)

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$

O cálculo do limite de detecção (LOD) (WENZL et al., 2016) foi realizado de acordo com a Equação 3, obtendo-se um valor de 5,6 ng/ml H-FABP.

$$\text{LOD} = 3 * \frac{S_{by}}{b} \quad (3)$$

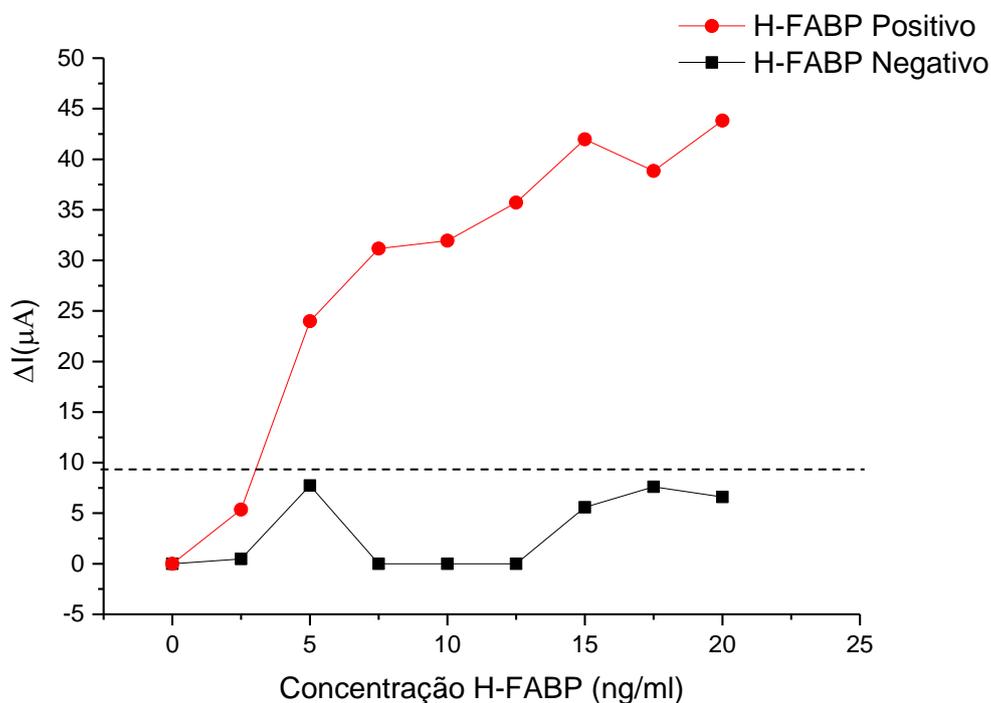
O limite de quantificação (LOQ) foi definido pela Equação 4, cujo resultado foi de 15,07 ng/ml.

$$\text{LOQ} = 10 * \frac{S_{by}}{b} \quad (4)$$

Os resultados de respostas de correntes de pico anódicas (I_p) demonstraram um aumento linear concomitante ao aumento de concentração, a partir de respostas de I_p que permaneceram constantes em relação à linha de base. Nesse sentido, é possível afirmar que o imunossensor foi capaz de distinguir o H-FABP em soro positivo, com o valor do Limite de Reação (*Cut-off*) em aproximadamente 9,62 ng/ml (demarcado pela linha pontilhada na figura 10), 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 1,0 e 19,9 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 11: 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 50 mV/s.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4. CONCLUSÕES

Um imunossensor nanohíbrido eletroquímico para detecção do H-FABP foi desenvolvido indicando boas perspectivas para diagnóstico emergencial do IAM. A forte estabilidade das biomoléculas não marcadas imobilizadas resultou em filme firmemente aderido à superfície, estável e reproduzível, com uma faixa de resposta linear dentro dos limites clínicos de interesse para o diagnóstico precoce.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), processo número PBPG-0739-3.13/17.

REFERÊNCIAS

- BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, 2018
- BIEßMANN, L. *et al.* Monitoring the Swelling Behavior of PEDOT:PSS Electrodes under High Humidity Conditions. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 11, p. 9865–9872, 21 mar. 2018
- BRAILE-STERNIERI, M. C. V. B. *et al.* Main Considerations of Cardiogenic Shock and Its Predictors: Systematic Review. **Cardiology Research**, 2018
- CAI, W. *et al.* Dedoping-induced interfacial instability of poly(ethylene imine)s-treated PEDOT:PSS as a low-work-function electrode. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 1, p. 328–336, 19 dez. 2019
- CECCHETTO, J. *et al.* Serological point-of-care and label-free capacitive diagnosis of dengue virus infection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, p. 111972, 1 mar. 2020
- COSTA, F. A. S. *et al.* Perfil demográfico de pacientes com infarto agudo do miocárdio no Brasil: revisão integrativa. **SANARE**. v. 17 n. 2, p.66-73, 2019
- DELLAS, C. *et al.* Risk stratification of acute pulmonary embolism based on clinical parameters, H-FABP and multidetector CT. **International Journal of Cardiology**, v. 265, p. 223–228, 15 ago. 2018
- 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, 13 ago. 2003
- DU, X. *t al.* An electrochemical biosensor for the detection of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2020
- ENGEL, G.; ROCKSON, S. G. Feasibility and Reliability of Rapid Diagnosis of Myocardial Infarction. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 359, n. 2, p. 73–78, 1 fev. 2020
- FISCHER, A. A.; LINDEMAN, S. V.; FIEDLER, A. T. Spectroscopic and computational studies of reversible O₂ binding by a cobalt complex of relevance to cysteine dioxygenase. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 39, p. 13229–13241, 10 out. 2017
- GOMES-FILHO, S. L. R. *et al.* A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**. v. 109, 2013
- 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

HARROGATE, S. A retrospective analysis of inpatient cardiac arrests over one year at a tertiary heart attack and cardiothoracic centre identifying potential candidates for an inpatient extracorporeal cardiopulmonary resuscitation service. **Journal of the Intensive Care Society**. v. 0, n. 0, 2019

HO, S. K. *et al.* The prognostic significance of heart-type fatty acid binding protein in patients with stable coronary heart disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2018

KIM, S.M. *et al.* High-performance, polymer-based direct cellular interfaces for electrical stimulation and recording. **NPG Asia Mater.** 2018

KOUR, R. *et al.* Review-Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors. 2020

LAI, J. Y. Corneal stromal cell growth on gelatin/chondroitin sulfate scaffolds modified at different NHS/EDC molar ratios. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 2036–2055, 21 jan. 2013

MARTINEZ, P. F. *et al.* Biomarcadores no Diagnóstico e Prognóstico do Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 113, n. 1, p:40-41, 2019

NSABIMANA, A. *et al.* Nanomaterials-based Electrochemical Sensing of Cardiac Biomarkers for Acute Myocardial Infarction: Recent Progress. **Electroanalysis**. v. 31, p. 177–87, 2019

OLIVEIRA, A.C.; SANTOS, C.G. HOFFMANN E. Uso de novos biomarcadores cardíacos no diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. **NewsLab**. Ano 25. 2018

OLIVEIRA, W.F.; SILVA, P.M.S.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Biomarkers, Biosensors and Biomedicine. **Current Medicinal Chemistry**. 2019

Organização Mundial de Saúde. The top 10 causes of death. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 18 nov 2019

WILLEMSEN, R. T. *et al.* Evaluating possible acute coronary syndrome in primary care: the value of signs, symptoms, and plasma heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). A diagnostic study. **BJGP Open**, p. bjgpopen19X101652, 9 jul. 2019

PAMPALONI, N. P. *et al.* Advances in Nano Neuroscience: From Nanomaterials to Nanotools. **Frontiers in Neuroscience**. v. 12, n. January, p. 1–16, 2019

PARLAK, O. *et al.* Wearable biosensors and sample handling strategies. *In: Wearable Bioelectronics*. [s.l.] Elsevier, p. 65–88, 2020

PORCU, A. *et al.* Electrically conductive gels of single wall carbon nanotubes and PEDOT:PSS. **Bulletin of the American Physical Society**, 2020

RETTETTER, U. et al. On the impedance of potassium nickel(II) hexacyanoferrate(II) composite electrodes—the generalization of the Randles model referring to inhomogeneous electrode materials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 546, p. 87-96, 2003.

TSUTSUI, H.; LILLEHOJ, P. B. Flexible Analytical Devices for Point-of-Care Testing. **SLAS technology**, v. 25, n. 1, p. 6–8, 20 fev. 2020.

VASANTHAM, S. et al. Paper based point of care immunosensor for the impedimetric detection of cardiac troponin I biomarker. **Biomedical Microdevices**, v. 22, n. 1, p. 6, 1 mar. 2020.

VILLEMIN, E. et al. Improved adhesion of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) thin film to solid substrates using electrografted promoters and application to efficient nanoplasmonic devices. **Synthetic Metals**, v. 248, p. 45–52, 1 fev. 2019.

WAFI, M.A. et al. Heart-type fatty-acid-binding protein is a prognostic biomarker for sepsis outcome and sepsis-related left-ventricular dysfunction: a comparison with troponin I. **Research and Opinion in Anesthesia and Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 42, 2018.

WANG, C. et al. Electrochemical biosensors based on antibodies, nucleic acids and enzymes functionalized graphene for the detection of disease-related biomolecules. **The Analyst**, 2020.

WENZL, T. et al. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food 2016 EUR 28099 EN. 2016.

XU, H.; DIOLINTZI, A.; STORCH, J. Fatty acid-binding proteins. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 22, n. 6, p. 407–412, 1 nov. 2019.

YE, G. et al. **One-Step Electrodeposition Method to Prepare Robust Flexible PEDOT-Based Films for Ultra-Stable Supercapacitors** *ChemElectroChem*, 2018.

YOUSEFI et al. Electrochemical-Based Biosensors: New Diagnosis Platforms for Cardiovascular Disease. **Current Vascular Pharmacology**. 2019

ZHANG, Y. et al. L-cysteine functionalized straticulate C3N4 for the selective enrichment of glycopeptides. **Journal of Chromatography A**, v. 1610, p. 460545, 11 jan. 2020

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados pode-se inferir que o imunossensor nanohíbrido eletroquímico apresentou respostas analíticas satisfatórias por meio de soro humano enriquecido, com poder discriminatório da condição patológica a partir do reconhecimento da molécula-alvo. A plataforma utilizada rendeu filmes estáveis e com boa reprodutibilidade por meio da utilização de nanocompósitos inovadores na área, como o PEDOT:PSS em sinergismo com nanotubos de carbono e a L-Cisteína. Como perspectivas deste trabalho, pretende-se ampliar os números de testes e provas analíticas utilizando amostras reais a partir de soro e sangue de pacientes infartados e controles. 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

- AHUJ, T., MIR, I. A., KUMAR, D., RAJESH. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, 791–805, 2007
- ALESSI, I.A.G. **Voltametria de pulso diferencial como alternativa no monitoramento de cádmio, chumbo e cobre em lodo de estações de tratamento de água para sua possível utilização na agricultura**. 2018. Monografia (Graduação) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018
- AL-HADI, H. A.; WILLIAM, B.; FOX, K. A. Serum level of heart-type Fatty Acid-binding protein in patients with chronic renal failure. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 9, n. 3, p. 311–4, dez. 2009
- ALQARNI, S. A. *et al.* Composite Material–Based Conducting Polymers for Electrochemical Sensor Applications: a Mini Review. **BioNanoScience**, p. 1–14, 2020
- ALVES, M.G.; NASCIMENTO, M.G.; BARBORANA, T.A.; CRUZ, V.L.B., Dor torácica: análise e discussão dos atendimentos em um hospital de Minas Gerais. **Academus Revista Científica da Saúde**, v. 4, n. 2, 2019
- ANVARI, M. S.; BOROUMAND, M.; BOZORGI, A. Complementary Diagnostic Value of Heart Type Fatty Acid-binding Protein in Early Detection of Acute Myocardial Infarction Cardiovascular genetics View project Antimicrobial resistance View project. **Critical Pathways in Cardiology**, v. 17, n. 1, 2018
- ARDUINI, F. *et al.* Nanomaterial-based sensors. *In: Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*. [s.l.] Elsevier, p. 329–359, 2020
- ARYAL, S. *et al.* Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. **Spectrochimica acta. Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 63, n.1, p.160-3, 2005
- ATAY, E. *et al.* Role of Gal-3 and H-FABP in the early diagnosis of acute coronary syndrome. **Bratislava Medical Journal**, v. 120, n. 2, p. 124–130, 2019
- BACE, E. *et al.* H-FABP – A sensitive biomarker of early diagnosis and prediction of myocardial damage. **Atherosclerosis**, v. 275, p. e254, ago. 2018
- BALAHURA, L. R. *et al.* Advances in immunosensors for clinical applications. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, Taylor and Francis Inc. , 2 jan. 2019
- BANK, I. E. *et al.* S 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**, v. 5, n. 4, p. 364-74, 2016

BANSOD, B. K. *et al.* A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 94, p. 443-455, 2017

BARBOSA J.R. **Influência de parâmetros de impressão 3d como geometria interfacial e preenchimento sobre comportamento eletroquímico de eletrodos a base de ácido poli(lático)**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019

BENJAMIN, E.; MUNTNER, P.; BITTENCOURT, M. S. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report From the American Heart Association (2019). **Circulation**. v. 139, n. 10, p. e56-e528, 2019

BEZZON, V. D. N. *et al.* Carbon Nanostructure-based Sensors: A Brief Review on Recent Advances. **Advances in Materials Science and Engineering**. Hindawi Limited, 2019

BIEßMANN, L. *et al.* Monitoring the Swelling Behavior of PEDOT:PSS Electrodes under High Humidity Conditions. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 11, p. 9865–9872, 21 mar. 2018

BORBA, L.P.; HUBERT, G.; GIARETTA, D.S.; BODANESE, L.C. Infarto agudo do miocárdio. **Acta médica (Porto Alegre)**, v. 37, p. 8, 2016

BRAILE-STERNIERI, M. C. V. B. *et al.* Main Considerations of Cardiogenic Shock and Its Predictors: Systematic Review. **Cardiology Research**, 2018

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

CAI, W. *et al.* Dedoping-induced interfacial instability of poly(ethylene imine)s-treated PEDOT:PSS as a low-work-function electrode. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 1, p. 328–336, 19 dez. 2019

CARDENAS-BENITEZ, B. *et al.* Review—Covalent Functionalization of Carbon Nanomaterials for Biosensor Applications: An Update. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 3, p. B103–B117, 1 jan. 2018

CECCHETTO, J. *et al.* Serological point-of-care and label-free capacitive diagnosis of dengue virus infection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, p. 111972, 1 mar. 2020

COLMENERO, F. Mechanical properties of anhydrous oxalic acid and oxalic acid dihydrate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 5, p. 2673–2690, 30 jan. 2019

COSTA, F. A. S. *et al.* Perfil demográfico de pacientes com infarto agudo do miocárdio no Brasil: revisão integrativa. **SANARE**, v. 17 n. 2, p.66-73, 2019

DAI, H., ZHANG, S., HONG, Z., & LIN, Y. A potentiometric addressable Photoelectrochemical biosensor for sensitive detection of two biomarkers. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 19, p. 9532-8, 2016

DAMHOFF, T. C.; HUECKER, M. R. **Myocardial Infarction, Serum Markers**. [s.l.] IStatPearls Publishing, 2018.

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.

DEBNATH, N.; DAS, S. Biomedical Nano Tools: A Potential New Paradigm for Immunoassays and Immune Detection. **Current Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 98–107, 8 fev. 2019

DELLAS, C. *et al.* Risk stratification of acute pulmonary embolism based on clinical parameters, H-FABP and multidetector CT. **International Journal of Cardiology**, v. 265, p. 223–228, 15 ago. 2018

DI PIETRANTONIO, F.; CANNATÀ, D.; BENETTI, M. Biosensor technologies based on nanomaterials. *In*: **Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications**. p.181–242, 2019

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, 13 ago. 2003

DU, X. *t al.* An electrochemical biosensor for the detection of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2020

EL-SAID, W. A. *et al.* Application of Conducting Polymer Nanostructures to Electrochemical Biosensors. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 307, 12 jan. 2020

ENGEL, G.; ROCKSON, S. G. Feasibility and Reliability of Rapid Diagnosis of Myocardial Infarction. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 359, n. 2, p. 73–78, 1 fev. 2020

FARIA, R. A. D. Estudo para o desenvolvimento de biossensor impedimétrico não marcado para detecção de veneno ofídico. 2017. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017

FISCHER, A. A.; LINDEMAN, S. V.; FIEDLER, A. T. Spectroscopic and computational studies of reversible O₂ binding by a cobalt complex of relevance to cysteine dioxygenase. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 39, p. 13229–13241, 10 out. 2017

GAUDIN, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 363–377, 2017

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**. Elsevier, 15 jul. 2014

GREENSLADE, J. H. *et al.* Factors influencing physician risk estimates for acute cardiac events in emergency patients with suspected acute coronary syndrome. **Emergency Medicine Journal**, v. 37, n. 1, p. 2–7, 1 jan. 2020

GRIMM, K. *et al.* Diagnostic and prognostic value of ST-segment deviation scores in suspected acute myocardial infarction. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, p. 204887261985357, 24 jan. 2020

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

HAGER, G.; BROLO, A.G. Adsorption/desorption behaviour of cysteine and cystine in neutral and basic media: electrochemical evidence for differing thiol and disulfide adsorption to a Au (1 1 1) single crystal electrode. **Electroanalytical Chemistry**. v. 550, n. 291, 2003

HARROGATE, S. A retrospective analysis of inpatient cardiac arrests over one year at a tertiary heart attack and cardiothoracic centre identifying potential candidates for an inpatient extracorporeal cardiopulmonary resuscitation service. **Journal of the Intensive Care Society**. v. 0, n. 0, 2019

HO, S. K. *et al.* The prognostic significance of heart-type fatty acid binding protein in patients with stable coronary heart disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2018

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

INGREMEAU, D. *et al.* Prognostic impact of body mass index on in-hospital bleeding complications after ST-segment elevation myocardial infarction. **World Journal of Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 44–54, 26 jan. 2020

ISLAM, M. N.; CHANNON, R. B. Electrochemical sensors. *In: Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*. [s.l.] Elsevier, p. 47–71, 2020

JIN, Y., XIE, Y., WU, K., HUANG, Y., WANG, F., & ZHAO, R. Probing the dynamic interaction between damaged DNA and a cellular responsive protein using a piezoelectric mass biosensor. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v. 9, n. 10, 8490–7, 2017

KABEKKODU, S. P.; MANANJE, S. R.; SAYA, R. P. A Study on the Role of Heart Type Fatty Acid Binding Protein in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, v. 10, n. 1, p. OC07, 2016

KAI-HUA CHOW, E.; GU, M.; XU, J. Carbon nanomaterials: fundamental concepts, biological interactions, and clinical applications. *In: Nanoparticles for Biomedical Applications*. [s.l.] Elsevier, p. 223–242, 2020

KAYSER, L.V.; LIPOMI, D.J. Stretchable Conductive Polymers and Composites Based on PEDOT and PEDOT:PSS. **Advanced Materials**. v.31, n.10, 2019

KIM, S.M. et al. High-performance, polymer-based direct cellular interfaces for electrical stimulation and recording. **NPG Asia Mater**. 2018

KOEHN, J.E. **Carbon Nanomaterials for Biosensing Applications**. NIH Protein Biotechnology Symposium; 5 Apr. 2019; Pullman, WA; United States.2019

KOUR, R. *et al.* **Review-Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors**. 2020

KURALAY, F. Nanomaterials-Based Enzyme Biosensors for Electrochemical Applications: Recent Trends and Future Prospects. **New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis**, p. 381–408, 2019

LAGERSTEDT, L. et al. Combining H-FABP and GFAP increases the capacity to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. **PLoS ONE**. v. 13, n. 7, p. e0200394, 2018

LAI, J. Y. Corneal stromal cell growth on gelatin/chondroitin sulfate scaffolds modified at different NHS/EDC molar ratios. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 2036–2055, 21 jan. 2013

LEI, R.; HUO, R.; MOHAN, C. Current and emerging trends in point-of-care urinalysis tests. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v.20, p. 69-84, 2020

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

LOS SANTOS ÁLVAREZ, N. DE; FERNÁNDEZ ABEDUL, M. T. Determination of ascorbic acid in dietary supplements by cyclic voltammetry. *In: Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*. [s.l.] Elsevier, p. 13–23, 2020

MAITI, D. *et al.* Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 11 mar. 2019

MANSURIYA, B. D.; ALTINTAS, Z. Graphene Quantum Dot-Based Electrochemical Immunosensors for Biomedical Applications. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 96, 23 dez. 2019.

MARTINEZ, P. F. et al. Biomarcadores no Diagnóstico e Prognóstico do Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 1, p:40-41, 2019

MAZIUKIEWICZ, D. *et al.* Designing biocompatible spin-coated multiwall carbon nanotubes-polymer composite coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 385, p. 125199, 15 mar. 2020

MCKILLOP, I. H.; GIRARDI, C. A.; THOMPSON, K. J. Role of fatty acid binding proteins (FABPs) in cancer development and progression. **Cellular Signalling**. v.62, p. 10933, 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Informações de saúde, epidemiológicas e morbidade**: banco de dados. Brasília: DATASUS, 2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/qiuf.def>. Acesso em: 14 dez. 2019

MIRCESKI, V. *et al.* Differential Square-Wave Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 23, p. 14904–14910, 3 dez. 2019

MITTAL, S., KAUR, H., GAUTAM, N., & MANTHA, A. K. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 217-31, 2017

MOORE, T. *et al.* In Vitro and In Vivo SERS Biosensing for Disease Diagnosis. **Biosensors**, v. 8, n. 2, p. 46, 11 maio 2018

MORROW, A. *et al.* Treating the troponin: adverse consequences of over-treatment of elevated troponin in non-coronary presentations. **Scottish Medical Journal**. v. 64, n. 1, p. 10-15, 2018

MUEHLSCHLEGEL, J. D. *et al.* Heart-type fatty acid binding protein is an independent predictor of death and ventricular dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. **Anesthesia and Analgesia**, v. 111, n. 5, p. 1101–1109, nov. 2010

NARWAL, *et al.* Cholesterol biosensors: A review. **Steroids**. v. 143, p. 6-17, 2019

NEGRI, V. *et al.* **Carbon Nanotubes in Biomedicine** Topics in Current Chemistry. Springer, 1 fev. 2020

NGUYEN, H. H. *et al.* **Immobilized enzymes in biosensor applications** Materials. MDPI AG, 2 jan. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609693>. Acesso em: 14 fev. 2020

NOVO, G.; NUGARA, C.; LANCELLOTTI, P. Early Detection of Cardiac Damage. *In*: [s.l.] **Humana Press**, Cham, p. 151–163, 2019

NSABIMANA, A. *et al.* Nanomaterials-based Electrochemical Sensing of Cardiac Biomarkers for Acute Myocardial Infarction: Recent Progress. **Electroanalysis**. v. 31, p. 177–87, 2019

OLIVEIRA, A.C.; SANTOS, C.G. HOFFMANN E. Uso de novos biomarcadores cardíacos no diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. **NewsLab**. Ano 25. 2018

OLIVEIRA, W.F.; SILVA, P.M.S.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Biomarkers, Biosensors and Biomedicine. **Current Medicinal Chemistry**.2019

Organização Mundial de Saúde. The top 10 causes of death. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 18 nov 2019

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

PADHY, S. *et al.* **The Power of Tensor-Based Approaches in Cardiac Applications**. *In*: Singapore: Springer, p. 291–323, 2020

PAMPALONI, N. P. et al. Advances in Nano Neuroscience: From Nanomaterials to Nanotools. **Frontiers in Neuroscience**. v. 12, n. January, p. 1–16, 2019

PARLAK, O. *et al.* Wearable biosensors and sample handling strategies. *In*: **Wearable Bioelectronics**. [s.l.] Elsevier, p. 65–88, 2020

PAVLIN, M. ET AL. Unraveling the Impact of Cysteine-to-Serine Mutations on the Structural and Functional Properties of Cu(I)-Binding Proteins. Department of Chemistry, Faculty of Exact Sciences, Bar Ilan University, **Ramat-Gan Int. J. Mol. Sci.** v. 20,n. 14, p. 3462, 2019

PAZOS, C.P. et al. Comportamiento del infarto agudo de miocardio en pacientes hospitalizados. **Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias**. v. 18, n.2, 2019

PEREIRA, J.; SILVEIRA, M. Unsupervised Representation Learning and Anomaly Detection in ECG SequencesInternational. **Journal of Data Mining and Bioinformatics**. v. 22, n. 4, p. 389-407, 2019

PIRZADA, M.; ALTINTAS, Z. Nanomaterials for Healthcare Biosensing Applications. **Sensors**, v. 19, n. 23, p. 5311, 2 dez. 2019

PORCU, A. *et al.* Electrically conductive gels of single wall carbon nanotubes and PEDOT:PSS. **Bulletin of the American Physical Society**, v. 65, n.1, 2020

QIAN, S.; LI, Y.; CIRINO, P. C. Biosensor-guided improvements in salicylate production by recombinant Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 18, 29 dez. 2019

RAMONAS, E. *et al.* Highly sensitive amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase for determination of glycerol in human urine. **Talanta**, v. 200, p. 333–339, 1 ago. 2019

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

RETTNER, U. et al. On the impedance of potassium nickel(II) hexacyanoferrate(II) composite electrodes—the generalization of the Randles model referring to inhomogeneous electrode materials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 546, p. 87-96, 2003

REZAR, R. et al. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) and Its Role as a Biomarker in Heart Failure: What Do We Know So Far? **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 164, 7 jan. 2020

SALOMÃO, P.E.A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Research, Society and Development**. v. 7, n. 3, p. 01-11, e1373282, 2018

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

SANDHYARANI, N. Chapter 3 - Surface modification methods for electrochemical biosensors. **Electrochemical Biosensors**, p. 45-75, 2019

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

SHANDILYA, R. et al. Nanobiosensors: Point-of-care approaches for cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 130, P.147-1651, 2019

SILVA, F. L.; MELO, M. A. B. DE; NEVES, R. A. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes internados por infarto agudo do miocárdio em hospital de Goiás. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 5, n. 13, 11 nov. 2019

SILVA, P. M. S. Caracterização do padrão de glicosilação do antígeno prostático humano (psa) em soro humano pela lectina cramoll 1,4 utilizando um biossensor eletroquímico baseado em nanotubo de carbono. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia. 2015

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

SOUZA-SILVA, M.V.R. et al. Implementation of an Acute Coronary Syndrome Simulation Training Strategy for Emergency Healthcare Professionals. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. v. 32, n. 3, p.227-237, May-June, 2019

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

TANISELASS, S.; ARSHAD, M.M.Md.; GOPINATH, S.C.B. Graphene-based electrochemical biosensors for monitoring noncommunicable disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 130, p. 276-2921, 2019

TSUTSUI, H.; LILLEHOJ, P. B. Flexible Analytical Devices for Point-of-Care Testing. **SLAS technology**, v. 25, n. 1, p. 6–8, 20 fev. 2020

ULUKAN, M. O. et al. Comparisons of heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) levels in off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting. **Archives of Medical Science - Atherosclerotic Diseases**. v. 4, p. e119–e125, 2019

VASANTHAM, S. *et al.* Paper based point of care immunosensor for the impedimetric detection of cardiac troponin I biomarker. **Biomedical Microdevices**, v. 22, n. 1, p. 6, 1 mar. 2020

VILLEMIN, E. *et al.* Improved adhesion of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) thin film to solid substrates using electrografted promoters and application to efficient nanoplasmonic devices. **Synthetic Metals**, v. 248, p. 45–52, 1 fev. 2019

WAFI, M.A. *et al.* Heart-type fatty-acid-binding protein is a prognostic biomarker for sepsis outcome and sepsis-related left-ventricular dysfunction: a comparison with troponin I. **Research and Opinion in Anesthesia and Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 42, 2018

WANG, C. *et al.* Electrochemical biosensors based on antibodies, nucleic acids and enzymes functionalized graphene for the detection of disease-related biomolecules. **The Analyst**, 2020

WELSH, P. et al. High-Sensitivity Troponin T and Incident Heart Failure in Older Men: British Regional Heart. **Journal of Cardiac Failure**. v. 25, n. 4, p. 230-7, 2019

WENZL, T. *et al.* Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food 2016 EUR 28099 EN. 2016

WILLEMSEN, R. T. *et al.* Evaluating possible acute coronary syndrome in primary care: the value of signs, symptoms, and plasma heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). A diagnostic study. **BJGP Open**, p. bjgopen19X101652, 9 jul. 2019

XU, H.; DIOLINTZI, A.; STORCH, J. Fatty acid-binding proteins. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 22, n. 6, p. 407–412, 1 nov. 2019.

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

YE, G. *et al.* One-Step Electrodeposition Method to Prepare Robust Flexible PEDOT-Based Films for Ultra-Stable Supercapacitors. **ChemElectroChem**, 2018

YOON, J. *et al.* Highly Sensitive Biosensors Based on Biomolecules and Functional Nanomaterials Depending on the Types of Nanomaterials: A Perspective Review. **Materials**, v. 13, n. 2, p. 299, 9 jan. 2020

YOUSEFI *et al.* Electrochemical-Based Biosensors: New Diagnosis Platforms for Cardiovascular Disease. **Current Vascular Pharmacology**. 2019

ZAMANI, F.G. *et al.* Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v.118, p. 264-76, 2019

ZANATO, N. Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de troponina cardíaca utilizando nanopartículas de ouro e nanoplaquetas de grafite. Graduação (Monografia) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Curso de Química, 2016

ŽEBROWSKA, A. *et al.* Acute Responses of Novel Cardiac Biomarkers to a 24-h Ultra-Marathon. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 57, 8 jan. 2019

ZHANG, Y. *et al.* L-cysteine functionalized straticulate C3N4 for the selective enrichment of glycopeptides. **Journal of Chromatography A**, v. 1610, p. 460545, 11 jan. 2020

ZOU, H.C.B.; TU, Y. An electrochemiluminescence immunosensor for myoglobin using an indium tin oxide glass electrode modified with gold nanoparticles and platinum nanowires. **Microchimica Acta**. v. 186, p.598, 2019