



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO
EMPREGANDO NANOHÍBRIDO PIRROL – NANOTUBOS DE
HALOISITA PARA DETECÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA
HUMANA

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

Recife, PE.

2014

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO
EMPREGANDO NANOHÍBRIDO PIRROL – NANOTUBOS DE
HALOISITA PARA DETECÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* de Engenharia Biomédica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife, PE.

2014

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

L257d Landim, Vicente de Paulo dos Anjos.
Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico empregando nanohíbrido
Pirrol – nanotubos de haloisita para detecção da troponina T cardíaca humana /
Vicente de Paulo dos Anjos Landim. - Recife: O Autor, 2014.
69 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Amalia Fireman Dutra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2014.
Inclui Referências e Apêndice.

1. Engenharia Biomédica. 2. Pirrol-2-carboxílico. 3. Nanotubos de
haloisita. 4. Imunossensor eletroquímico. 5. Troponina T cardíaca humana.
6. Infarto agudo do miocárdio. I. Dutra, Rosa Amalia Fireman.
(Orientadora). II. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2014-161

VICENTE DE PAULO DOS ANJOS LANDIM

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO
EMPREGANDO NANOHÍBRIDO PIRROL – NANOTUBOS DE
HALOISITA PARA DETECÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA
HUMANA**

AVALIADORES:

Prof^a. Dr^a. Rosa Amalia Fireman Dutra

(Depto. Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco) - Orientadora

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

(Depto. Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco) – 1º Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Yara

(Depto. Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco) - 2º Examinador:

Dr^a. Alessandra Batista de Mattos,

(Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste)- 3ª Examinadora

Recife, PE.

2014

Dedico este trabalho a meu pai Antônio Landim (in memórian) e a minha mãe Suelita que lutaram, sonharam e me apoiaram de todas as formas para que eu estivesse alcançando cada objetivo. A tia Chiquinha, que dedicou sua vida a cuidar de mim, me abraçando como filho e acreditando nos meus sonhos. Aos meus irmãos pelo apoio em todos os momentos. Aos meus sobrinhos, por fazerem de mim o tio mais feliz do mundo.

AGRADECIMENTOS

Em especial a **Deus** por estar me dando a chance de desfrutar de todos os meus sonhos, por me iluminar a cada dia para seguir nessa caminhada, por me fortalecer e amparar sempre em seus braços de amor.

À professora e orientadora **Rosa Fireman Dutra**, pela orientação, amizade, paciência nesta fase de aprendizado, dedicação e principalmente pela oportunidade que tem me dado de conhecer esse novo mundo chamado nanotecnologia e por ter me acolhido tão bem em seu laboratório.

À minha co-orientadora, colega de trabalho e amiga **Bárbara Virgínia**, pela dedicação, amizade, paciência, momentos de descontração tornando o laboratório um ambiente ainda melhor e acima de tudo por aceitar esse desafio de estar comigo nesse projeto. Não tenho como agradecer tamanho apoio e dedicação. Muito Obrigado!

Aos meus pais, **Antônio Landim** e **Suelita Landim**, pelo carinho, amor, dedicação e por estarem sempre comigo lutando e acreditando nos meus sonhos, obrigado pelas oportunidades a mim oferecidas, para minha formação pessoal e profissional. De um modo especial quero agradecer a minha mãe por abrir mão da convivência diária comigo para que eu estivesse hoje aqui realizando um dos meus sonhos e aprender que amar também é abrir mão de quem amamos.

A minha tia **Chiquinha da Glória**, por ser sempre uma segunda mãe, me acolhendo, amando e investindo em minha educação. Te amo!

Aos meus irmãos **Yáskara, Antônio Filho e Luciano** pelo amor, suporte, apoio e fortaleza.

Aos meus sobrinhos **Antônio Neto, Isabelly e Ana Júlia** por me fazerem me sentir o tio mais amado e feliz do mundo. Amo vocês!

Aos familiares de um modo geral, tios, primos, cunhados e avó pelos momentos bons e até mesmo por aqueles que na dor me fizeram aprender que nada acontece por acaso e que família é isso.

Ao amigo **Bruno Nunes**, não tenho como esquecer tanto que fizestes por mim, o apoio incondicional, a amizade, os ensinamentos nessa nova vida de muitas mudanças e principalmente por acreditar que tudo iria dar certo, te amo amigo!

Aos amigos de Recife, **Heberth Macedo, Micaias Júnior, Henrique Costa, Rosana Marinho, Eri Dias, Diego Leonardo, Fernanda e Edgard Santos** por terem me dado todo apoio não só profissional quanto pessoal, pelos momentos de descontração e amizade e por me tornarem não só amigo, mas parte da família de vocês. Muito Obrigado!

Aos amigos do Ceará, representados por **Vivi, Tatiana, Mariana e Tábada** pelo apoio desde os tempos da graduação e por continuarem comigo nessa jornada.

Aos amigos **Rogério, Carol Dias, Tatianny Freitas, Erika Lima, Alessandra Mattos, Igor Teixeira e Luciana Melo**, pela amizade, momentos de descontração, apoio e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À senhora **Maria Helena** por ter cedido carinhosamente o perclorato de lítio utilizado nos experimentos, muito obrigado!

Aos amigos do **LAPED**, com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado, pela contribuição no decorrer desta trajetória e pelos muitos momentos de descontração tornando o laboratório um ambiente mais prazeroso.

Aos **professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** que contribuíram para a formação do meu caráter e conduta científica.

Aos colegas de turma **Natália Onofre, Cayo Leal e Rodrigo Gomes**, por termos alcançado o que desejamos e conseguido vencer cada obstáculo.

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

Muito Obrigado!

“No fundo, apenas os pensamentos próprios são verdadeiros e têm vida, pois somente eles são entendidos de modo autêntico e completo. Pensamentos alheios, lidos, são como sobras da refeição de outra pessoa, ou como as roupas deixadas por um hóspede na casa.”

Schopenhauer

RESUMO

Diversos imunoenaios vem sendo empregados na rotina laboratorial para dosagem das troponinas cardíacas, devido a sua alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio. Entretanto, estes métodos apresentam significativas limitações para diagnóstico à beira do leito de pacientes infartados de modo prático, rápido e seguro. Dessa forma, os imunossensores eletroquímicos surgem como uma importante ferramenta analítica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um imunossensor eletroquímico baseado em um filme nanoestruturado de pirrol-2-carboxílico e nanotubos de haloisita para detecção de níveis clínicos da troponina T cardíaca humana. O eletrodo de carbono vítreo foi submetido à eletropolimerização do pirrol-2-carboxílico (0,01 M). Os grupos carboxílicos derivados do filme de pirrol na superfície sensora foram ativados e em seguida incubados com uma solução de nanotubos de haloisita funcionalizados com grupos amina (5 mg/mL). Para imobilização dos anticorpos anti-troponina T, o eletrodo de carbono foi previamente incubado com uma solução de glutaraldeído (5%). Os sítios ativos remanescentes do eletrodo foram bloqueados com uma solução de glicina. A caracterização do imunossensor foi realizada usando as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. A eletrossíntese do pirrol-2-carboxílico foi otimizada utilizando o perclorato de lítio como contra-íon na eletrossíntese do polímero, sob a velocidade de polimerização de 20 mV/s. O filme nanoestruturado de pirrol-2-carboxílico (0,01 M) e nanotubos de haloisita (5 mg/mL) apresentou uma estabilidade cinco vezes maior quando comparado ao estudo controle (sem pirrol-2-carboxílico). Ensaio para padronização da concentração do anticorpo anti-troponina T imobilizado e tempo de interação antígeno-anticorpo foram realizados e otimizados na concentração de 5 µg/mL e 60 min, respectivamente. Uma curva de calibração foi obtida para as diferentes concentrações de cTnT utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. O imunossensor proposto apresentou uma boa linearidade com $r=0,996$ ($p < 0,001$; $n = 6$) e limite de detecção de 0,008 ng/mL. O filme nanohíbrido de pirrol-2-carboxílico e nanotubos de haloisita para detecção eletroquímica da troponina T demonstrou propriedades desejáveis, tais como estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade.

Palavras-chave: pirrol-2-carboxílico; nanotubos de haloisita; imunossensor eletroquímico; troponina T cardíaca humana; infarto agudo do miocárdio.

ABSTRACT

Several immunoassays have been employed in laboratorial routine for measurement of the cardiac troponins due to their high sensitivity and specificity in the diagnosis of acute myocardial infarction. However, these methods have significant limitations for diagnosis at bedside of infarcted patients of a practical, rapid and secure way. Thus, electrochemical immunosensors emerge as an important analytical tool. The aim of this work was to develop an electrochemical immunosensor based on a nanostructured film of pyrrole-2-carboxylic acid and halloysite nanotubes for detection of clinical levels of human cardiac troponin T. Glassy carbon electrode was submitted to electropolymerization of pyrrole-2-carboxylic acid (0.01M). The carboxylic groups derivate of the pyrrole film on the sensor surface were activated and then incubated with a solution of halloysite nanotubes functionalized with amine groups (5 mg/mL). To immobilization of anti-troponin T antibodies, the carbon electrode was previously incubated with a solution of glutaraldehyde (5%). The remaining active sites of the electrode were blocked with a solution of glycine. The characterization of the immunosensor was performed using the cyclic voltammetry and differential pulse techniques. The electrosynthesis of pyrrole-2-carboxylic acid was optimized using lithium perchlorate as counter-ion in the electrosynthesis of the polymer, at scan rate of 20 mV/s. The nanostructured film of pyrrole-2-carboxylic acid (0.01 M) and halloysite nanotubes (5 mg/mL) showed a five-fold greater stability when compared to control study (without pyrrole-2-carboxylic acid). Assays for standardization of concentration of immobilized anti-troponin T antibody and antigen-antibody interaction time were carried out and optimized at the concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ and 60 min, respectively. A calibration curve was obtained to different concentrations of cTnT using square wave voltammetry technique. The proposed immunosensor showed a good linearity with $r=0,996$ ($p < 0,001$; $n = 6$) and limit of detection of 0.006 ng/mL. The nanohybrid film of pyrrole-2-carboxylic acid and halloysite nanotubes for electrochemical detection of troponin T demonstrated desirable properties, such as stability, reproducibility and sensitivity.

Keywords: pyrrole-2-carboxylic acid; halloysite nanotubes; electrochemical immunosensor; human cardiac troponin T, acute myocardial infarction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do processo fisiológico, que levam ao IAM, nas artérias coronarianas.	16
Figura 2 – Complexo troponina composto pelas subunidades T, C e I.	20
Figura 3 – Representação esquemática de um biossensor.	22
Figura 4 – Sistema eletroquímico constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar (fio de platina).	25
Figura 5 – Representação gráfica da técnica de VC: (a) variação linear do potencial vs. tempo e (b) voltamograma cíclico.	27
Figura 6 – Estrutura química do (a) monômero de Pi-2-COOH, (b) dímero e (c) oligômeros com 16 anéis conjugados após a eletropolimerização do Pi-2-COOH.	30
Figura 7 – Representações esquemáticas da (A) estrutura cristalina da haloisita (10 Å) e da (B) estrutura de um NTH.	31
Figura 8 – Potenciostato modelo Ivium Compact Stat acoplado ao microcomputador.	35
Figura 9 – Etapas de construção do imunossensor.	37
Figura 10 – Influência dos contra-íons empregados no processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH: (a) ECV limpo, (b) ECV eletropolimerizado em H ₂ SO ₄ (0,5 M), (c) ECV eletropolimerizado em KCl (0,1 M) e (d) ECV eletropolimerizado em LiClO ₄ (0,1 M). VCs obtidos em K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M) a velocidade de varredura de 100 mV/s.	41
Figura 11 – Influência da taxa de velocidade de varredura no processo de eletropolimerização e construção do filme de Pi-2-COOH: (a) ECV limpo, (b) ECV eletropolimerizado a 10 mV/s, (c) ECV eletropolimerizado a 20 mV/s, (d) ECV eletropolimerizado a 40 mV/s, (e) ECV eletropolimerizado a 80 mV/s e (f) ECV eletropolimerizado a 100 mV/s. <i>Inset</i> : Relação entre os valores de ΔE _p e velocidade de varredura de eletropolimerização. VCs realizados em K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 100 mV/s.	42
Figura 12 – Perfil eletroquímico do processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH (0,01 M) durante 20 ciclos voltamétricos em solução de 0,1 M de LiClO ₄ preparada em ACN, sob velocidade de varredura de 20 mV/s.	43
Figura 13 – VCs do ECVs modificado com diferentes concentrações de Pi-2-COOH: (a) ECV limpo, (b) ECV/Pi-2-COOH 0,001 M, (c) ECV/Pi-2-COOH 0,01 M, (d) ECV/Pi-2-COOH 0,02 M e (e) ECV/Pi-2-COOH 0,03 M. VCs realizados em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0,005 M) preparada em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 100 mV/s.	44
Figura 14 – VCs da influência do filme de NTHs-NH ₂ em clorofórmio sobre o perfil eletroquímico do ECV: (a) ECV limpo, (b) ECV modificado com clorofórmio e (c) ECV modificado um filme de NTH-NH ₂ (5 mg/mL) preparado em clorofórmio. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ preparada em 0,1 M de KCl.	45
Figura 15 – Influência das diferentes concentrações de NTHs-NH ₂ sobre ECV previamente eletropolimerizado com o Pi-2-COOH: (a) 1 mg/mL, (b) 2,5 mg/mL; (c) 5 mg/mL, (d) 7,5 mg/mL e (e) 10 mg/mL. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ preparada em 0,1 M de KCl.	46
Figura 16 – Estabilidade eletroquímica do ECV modificado com (a) NTHs-NH ₂ e (b) Pi-2-COOH/NTHs-NH ₂ quando submetidos a 20 sucessivos ciclos voltamétricos. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ preparada em 0,1 M de KCl.	47
Figura 17 – VCs do ECV/Pi-2-COOH/HNT-NH ₂ sob diferentes velocidades de varredura (a → h: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 mV/s). VCs realizados em K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M).	49
Figura 18 – (I) VCs e (II) VPD das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/Pi-2-COOH; (c) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH ₂ ; (d) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH ₂ /GLUT; (e) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH ₂ /GLUT/anti-cTnT e (f) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH ₂ /GLUT/Anti-	

cTnT/Glicina. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.	50
Figura 19 – Influência das diferentes concentrações de anti-cTnT imobilizado sobre o ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH ₂ /GLUT. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	51
Figura 20 – Influência do tempo de imunorreação para cTnT (0,05 ng/mL) em relação ao ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH ₂ /GLUT/Anti-cTnT/Glicina. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	52
Figura 21 – Curva de calibração do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de cTnT. Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	-	Acetonitrila
CK	-	“ <i>Chreatine kinase</i> ”- Creatinoquinase
CK-MB	-	“ <i>Chreatine kinase-myocardial band</i> ” – Isoforma cárdica da creatinoquinase
cTnI	-	Troponina I cardíaca humana
cTnT	-	Troponina T cardíaca humana
E	-	Potencial
ECV	-	Eletrodo de carbono vítreo
EDC	-	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EGC	-	Eletrocardiograma
EUA	-	Estados Unidos da América
HRP	-	Enzima peroxidase
I	-	Corrente
IAM	-	Infarto Agudo do Miocárdio
IL	-	Líquidos iônicos
I_{pa}	-	Corrente de pico anódico
I_{pc}	-	Corrente de pico catódico
IUPAC	-	“ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”- União Internacional de Química Pura e Aplicada
NTHs	-	Nanotubos de Haloisita
NHS	-	<i>N</i> -hidroxi succinimida
NTC	-	Nanotubos de Carbono
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PBS	-	Tampão fosfato salino
VC	-	Voltametria Cíclica
VPD	-	Voltametria de Pulso Diferencial
$v^{1/2}$	-	Raiz quadrada da velocidade de varredura
vs.	-	<i>Versus</i>
ΔI	-	Variações de corrente de pico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)	16
2.1.1 Marcadores cardíacos.....	17
2.1.2 Troponinas.....	19
2.2 BIOSSENSORES.....	21
2.2.1 Imunossensores.....	23
2.3 TRANSDUTORES	24
2.3.1 Transdutores Eletroquímicos	24
2.3.2 Técnicas Eletroquímicas.....	26
2.3.3 Voltametria Cíclica	26
2.4 MODIFICAÇÃO ELETRÓDICA	27
2.4.1 Polímeros.....	28
2.4.1 Polipirrol	29
2.4.2 Nanotubos de Halosita	30
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 REAGENTES	34
4.2 EQUIPAMENTOS	34
4.3 PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO	35
4.4 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PI-2-COOH	35
4.5 CONSTRUÇÃO DO FILME NANOHÍBRIDO DE PI-2-COOH/ NTHs-NH ₂	36
4.6 IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-CTNT	36
4.7 IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO	37
4.8 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS.....	38
4.8.1 Influência da velocidade de varredura na eletropolimerização do Pi-2-COOH.....	38
4.8.2 Estudo de estabilidade do filme de Pi-2-COOH/NTH	38
4.8.3 Influência da velocidade de varredura.....	38
4.8.4 Influência da concentração de anticorpo e tempo de imunorreação.....	39
4.8.5 Curva de calibração	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PI-2-COOH	40
5.2 CONSTRUÇÃO DO FILME NANOHÍBRIDO DE PI-2-COOH/NTH-NH ₂	44
5.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO IMUNOSSENSOR	49
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	51
5.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA CTNT	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

7. REFERÊNCIAS	55
-----------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo da ciência em rápida progressão, com grande impacto nas áreas de materiais, eletrônica e medicina (ZHANG *et al.*, 2009). Particularmente, a utilização de nanomateriais, obtidos em escala de 1–100 nm, tem despertado grande interesse nos últimos anos no desenvolvimento de nanossensores e imunossensores (JIANRONG *et al.*, 2004). Esses nanomateriais permitem o aumento da área reativa e da transferência de elétrons na interface sensora, contribuindo, conseqüentemente, para uma maior estabilidade do elemento biológico e quantidade de moléculas imobilizadas (JUBETE *et al.*, 2009; LUO, MORRIN & KILLARD, 2006). Diversos tipos de nanomateriais têm sido utilizados para o aperfeiçoamento dos imunossensores, incluindo nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e poliméricas (LEE *et al.*, 2007; LIU & LIN, 2007). Neste trabalho, nanomateriais derivados de minerais, tais como nanotubos de haloisita, foram empregados para construção da plataforma sensora, a haloisita é um argilo mineral semiconductor que tem sido amplamente utilizado em biossensores, podem ser facilmente funcionalizados com grupos carboxílicos, aumentam a resposta catalítica (PRICE & GABER; PRICE *et al.*, 2001).

Um dos grandes desafios na construção dos imunossensores consiste na fixação dos nanomateriais na interface sensora. Assim, filmes poliméricos funcionalizados têm sido uma alternativa para construção de plataformas mais estáveis e reprodutíveis, o que ainda tem sido um fator limitante no desenvolvimento de imunossensores. Devido à fácil síntese de preparação e reatividade redox, o polímero polipirrol tem recebido grande atenção, principalmente quando funcionalizado, permitindo a utilização de grupos reativos estratégicos na modificação da interface sensora (GRIESHABER, 2008; AHUJA *et al.*, 2007). Em meio aos derivados do pirrol funcionalizado, o pirrol-2-ácido carboxílico vem se destacando como material eletroativo para utilização em imunossensores.

O desenvolvimento de imunossensores para o diagnóstico de doenças cardiovasculares, tais como o infarto agudo do miocárdio (IAM), tem despertado o interesse de pesquisadores. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que até 2020 o IAM pode se tornar a principal causa de morte nos países em desenvolvimento (OMS, 2013). O diagnóstico rápido e prático do infarto é considerado

um fator fundamental para a redução da mortalidade e das possíveis sequelas para o paciente (MANSUR *et al.*, 2006). A demora na sua confirmação pode aumentar os riscos de complicações associadas à condição e o atraso para descartar o infarto pode contribuir para superlotação das emergências hospitalares, resultando em maiores custos para os sistemas de saúde (MENDIS *et al.*, 2011). Dentre os marcadores cardíacos para identificação do IAM, as troponinas cardíacas são consideradas “padrão-ouro” na prática clínica, devido a sua alta sensibilidade e cardiospecificidade (ACHAR, KUNDU & NORCROSS, 2005).

Neste trabalho, um imunossensor empregando filme nanohíbrido de pirrol-2-carboxílico (Pi-2-COOH) e nanotubos de haloisita funcionalizados com grupamentos amina (HNTs-NH₂) foi desenvolvido para detecção eletroquímica da troponina T cardíaca humana, visando contribuir no diagnóstico do IAM.

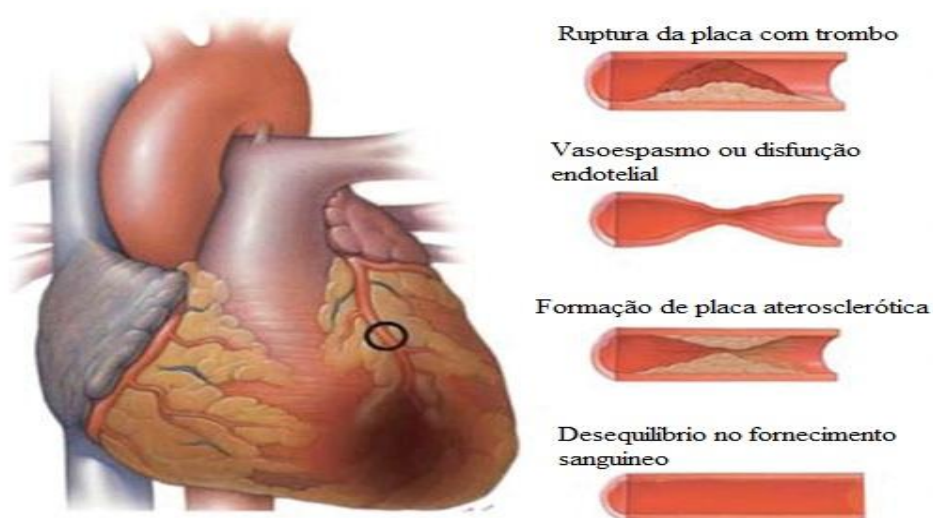
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

Síndrome coronariana aguda (SCA) é o termo designado a um amplo espectro de manifestações clínicas causadas pela isquemia do músculo cardíaco (BERTON & PALATINI, 2003). Entre as diversas manifestações clínicas que compreendem estas síndromes, o IAM tem se destacado como principal causa de hospitalização e atendimento em emergências cardiológicas (ALPERT *et al.*, 2000).

O IAM também pode ser provocado por uma ruptura súbita de uma placa aterosclerótica ou pela formação de um trombo arterial (**Figura 1**) (DAVIES, 2000). O IAM ocorre focalmente em regiões inespecíficas do coração, porém existe uma maior incidência no ventrículo esquerdo e no septo interventricular (LOPES, 2006). Também ocorre quando há morte do músculo cardíaco, resultante da oferta inadequada de oxigênio para o coração. Geralmente isso decorre da interrupção abrupta do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, que são vasos sanguíneos que transportam sangue para o músculo cardíaco (BASSAN *et al.*, 2002).

Figura 1 – Esquema do processo fisiológico, que levam ao IAM, nas artérias coronarianas.



(Fonte: THYGESEN, 2012)

O sintoma mais importante e típico do IAM é a dor precordial ou desconforto intenso retroesternal que é muitas vezes referida como aperto, opressão, peso ou queimação, podendo irradiar-se para pescoço, mandíbula, membros superiores e dorso. Frequentemente, esse sintoma vem acompanhado por náusea, vômito, sudorese, palidez e sensação de morte iminente (PESARO, SERRANO JR. & NICOLAU, 2004).

O IAM tem seu desenvolvimento acelerado pelos chamados fatores de risco cardiovasculares. Entre eles, os mais importantes são a idade (homens a partir dos 55 anos, mulheres após os 60 anos), diabetes, tabagismo, hipertensão arterial, altos níveis sanguíneos de colesterol, histórico familiar, obesidade e sedentarismo (ANTMAN *et al.*, 2008).

O eletrocardiograma (ECG) é um método diagnóstico bastante utilizado na avaliação inicial de paciente com IAM. Uma análise criteriosa do segmento ST e da onda T, no traçado eletrocardiográfico, representa um caminho para a tomada de decisão sobre como conduzir o raciocínio clínico. Adicionalmente o ECG, também prove informações relevantes para a melhor opção terapêutica e a estratificação prognóstica do paciente (HOLMVANG & LUSCHER, 1998).

Para o diagnóstico do IAM, os pacientes precisam apresentar pelo menos duas das três condições estabelecidas pela OMS: dor precordial forte, alterações no registro eletrocardiográfico e elevação dos marcadores cardíacos (YANG & ZHOU, 2006). Embora a investigação do ECG tem sido mais usual para diagnóstico do IAM, é crescente o percentual de pacientes infartados que não apresentam alterações no traçado eletrocardiográfico (SUPRUN *et al.*, 2010; MENDIS *et al.*, 2011). Técnicas de imagem, como a angiotomografia computadorizada, também vem sendo utilizadas para diagnóstico do IAM, porém encontram-se disponíveis apenas em poucos os órgãos públicos devido ao seu alto custo, dificultando, assim, o acesso da população. Atualmente, marcadores cardíacos são considerados importantes indicadores do IAM, pois possuem especificidade e sensibilidade para detecção de lesões no miocárdio (THYGESEN, 2012).

2.1.1 Marcadores cardíacos

Marcadores cardíacos são descritos como elementos proteicos da estrutura celular que são detectados na circulação sanguínea quando ocorrem lesões no miocárdio (ALPERT *et al.*, 2000; APPLE & MURAKAMI, 2005). Quando combinados a outros

métodos diagnósticos, como o ECG, os marcadores cardíacos podem resultar na efetiva determinação e triagem de pacientes infartados (ALPERT *et al.*, 2000).

A concentração plasmática do marcador biológico de injúria cardíaca pode variar dependendo da cinética de sua liberação, tempo transcorrido desde o início do processo isquêmico e do método analítico utilizado para sua detecção (RAMASAMY, 2011). Esses fatores justificam, assim, a medição seriada do marcador de necrose miocárdica que pode variar de uma dosagem para outra, sendo negativo na primeira e, posteriormente, ter um resultado positivo (SANTALO, GUINDO & ORDONEZ, 2003).

Os marcadores cardíacos mais utilizados na clínica médica incluem a mioglobina, a fração miocárdica da isoenzima creatinoquinase (“*chreatine kinase mioglobin*”- CK-MB) e as troponinas cardíacas, com cardioespecificidade variável entre elas (ACHAR, KUNDU & NORCROS, 2005). Contudo, o uso de alguns desses biomarcadores cardíacos tem sido discutido, já que podem ser encontrados em outros tecidos e estarem elevados em respostas a determinadas doenças ou condições, consequentemente comprometendo a sua especificidade para o diagnóstico do IAM (GODOY *et al.*, 2007).

A determinação da mioglobina no soro possui um elevado valor preditivo negativo sendo útil para descartar o diagnóstico do IAM, devido seu baixo peso molecular e distribuição citoplasmática. A mioglobina é liberada para a circulação rapidamente após lesão isquêmica da fibra miocárdica. Concentrações elevadas são observadas 1 a 2 horas após o início da dor precordial, atingindo o pico em 12 horas e, em geral, normalizando em 24 horas (ALPERT *et al.*, 2000; MORROW *et al.*, 2007).

A isoenzima CK-MB possui elevadas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de lesão do músculo cardíaco (ALPERT *et al.*, 2000). Em geral, na rotina clínica são realizadas três dosagens seriadas da CK-MB num período de 9 a 12 horas após admissão do paciente infartado. Se as três dosagens estiverem dentro dos intervalos de referência, o diagnóstico de IAM pode ser excluído. Preferencialmente, deve-se realizar a dosagem da massa de proteína correspondente à isoenzima (CK-MB massa) e não da atividade enzimática. A concentração da CK-MB se eleva de 3 a 8 horas após o processo lesivo, atinge um pico em 24 horas e normaliza em 72 a 96 horas (KARRAS & KANE, 2001). O intervalo de referência para confirmação do infarto através da dosagem da CK-MB é de até 5,0 ng mL⁻¹ (ANTMAN *et al.*, 2008).

Com a redefinição de IAM proposta por um comitê formado em 2000 pela *European Society of Cardiology* e pelo *American College of Cardiology*, as troponinas

cardíacas T (cTnT) e I (cTnI), tem sido recomendadas como marcadores “padrão ouro” para o diagnóstico de IAM (ALPERT *et al.*, 2000).

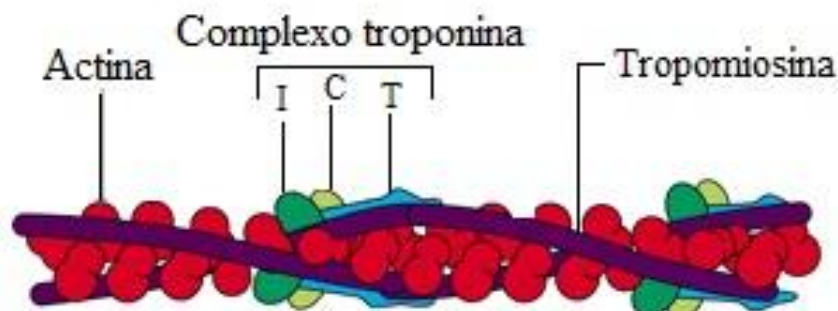
As troponinas cardíacas permitem cobrir uma parte importante das necessidades clínicas para avaliação diagnóstica e estratificação do risco de IAM em relação aos demais marcadores cardíacos. Visto que, na ausência de necrose miocárdica aguda ou subaguda, as concentrações das troponinas cardíacas no plasma são indetectáveis. Consequentemente, sua medida é absolutamente cardio-específica, permitindo reconhecer a necrose miocárdica de tamanho reduzido e a existência de IAM até mesmo em pacientes com angina instável, que não seriam reconhecidos utilizando-se outros marcadores (PLEBANI & ZANINOTTO, 1999; HERKNER *et al.*, 2001).

2.1.2 Troponinas

As troponinas são um complexo de proteínas regulatórias que agem no processo de contração muscular por meio da interação cálcio-dependente da miosina com a actina. São constituídas de três diferentes subunidades proteicas (troponina C, T e I) existentes no músculo esquelético e cardíaco, sendo codificadas por diferentes genes (**Figura 2**). A troponina C (TnC) é co-expressa nas fibras musculares esqueléticas de contração lenta e não é considerada como um marcador específico cardíaco (NICOLAU *et al.*, 2007).

As cTnT e cTnI apresentam sequências de aminoácidos individuais e específicos ao tecido cardíaco (COLLINSON & GAZE, 2005), permitindo a confecção de ensaios imunológicos por meio de anticorpos monoclonais para detecção de necrose do músculo cardíaco com alta especificidade (ALPERT *et al.*, 2000; ACHAR, KUNDU & NORCROSS, 2005; CAMERON *et al.*, 2007).

Figura 2 – Complexo troponina composto pelas subunidades T, C e I.



(Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/labs/lbcd/prodabi4/grupos/grupo1/outras.htm>)

Estruturalmente, as troponinas cardíacas encontram-se vinculadas ao aparato contrátil miofibrilar, entretanto, aproximadamente 7% da cTnT e 3 a 5% da cTnI estão livres no citoplasma (WU & FENG, 1998). Após o dano e rompimento da membrana celular dos cardiomiócitos em eventos de necrose, há um aumento bifásico das concentrações de troponinas no soro que correspondem à liberação inicial das proteínas livres no citoplasma, seguido da gradual dispersão das troponinas ligadas ao complexo miofibrilar. Assim, de acordo com a cinética de liberação, os níveis séricos das cTnT e cTnI podem ser mensurados após 2 a 4 horas do início dos sintomas clínicos do infarto e manter-se elevados por cerca de 4 a 7 dias para a cTnI, e 10 a 14 dias para a cTnT (JAFFE, BABUIN & APPLE, 2006; MORROW *et al.*, 2007).

Alguns autores atribuem à cTnI e cTnT a mesma especificidade e importância na avaliação dos danos cardíacos (PENTTILÄ *et al.*, 1999; PLEBANI & ZANINOTTO, 1999). Entretanto, para avaliar a extensão da lesão e tamanho do infarto, os valores de cTnT, quando quantificados entre 72 e 92 horas após o evento isquêmico, fornecem informações mais fidedignas do que a cTnI (LICKA *et al.*, 2002; STEEN *et al.*, 2006).

A cTnT é uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 36 kDa, e é produzida pelo gene TNNT2 (26875 bp). A sequência produzida por esse gene compreende 288 aminoácidos contendo regiões ricas em resíduos de ácido glutâmico e lisina (LÖWBER, 2007).

Diversos imunoensaios têm sido atualmente disponibilizados no mercado para dosagem da cTnT, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra sítios antigênicos específicos. Imunoensaios enzimáticos (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tipo "sanduíche", foram inicialmente descritos por KATUS e

colaboradores (1989) para detecção da cTnT, o Cardiac T Enzymun- Test® (Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha). Anticorpos monoclonais anti-cTnT conjugados à enzima peroxidase são utilizados nestes ensaios para detecção quantitativa da interação antígeno-anticorpo. Outros imunoensaios empregam reações de eletroquimioluminescência (ECLIA, do inglês, *Electrochemiluminescence Immunoassay*) para dosagem da cTnT, como o teste Elecsys® Troponin T STAT (Roche Diagnostics Mannheim, Alemanha). O princípio da técnica consiste na determinação de imunocomplexos, através da luminescência produzida por anticorpos monoclonais anti-cTnT conjugados ao rutênio, composto fotomultiplicador, quando aplicada uma determinada voltagem (TATE & PANTEGHINI, 2008). Estes métodos convencionais para diagnóstico da cTnT envolvem procedimentos complicados, diversas etapas bioquímicas e equipamentos relativamente caros (GILL, BEAVEN & COOK, 2006).

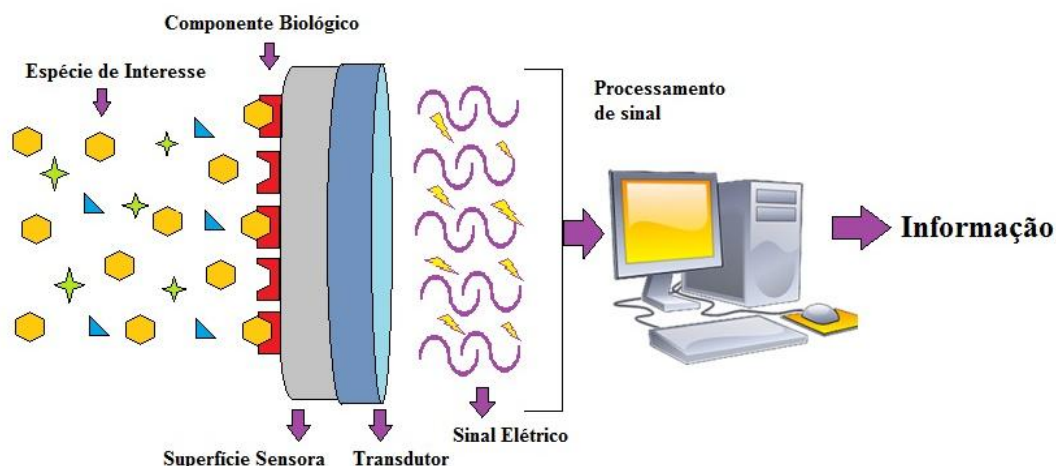
Sistemas mais práticos e portáteis, baseados no princípio dos testes imunocromatográficos, para determinação da cTnT tem sido aplicados na prática clínica, tais como o Cardiac Reader® (Roche Diagnostics Mannheim, Alemanha). Este método baseia-se na interação da cTnT circulante na amostra do paciente com anticorpos anti-cTnT conjugados a partículas de ouro coloidal em uma membrana de nitrocelulose (CHRISTENSON & AZZAZY, 2009). Entretanto, os ensaios imunocromatográficos apresentam apenas informações qualitativas, impossibilitando inferir sobre o dano e a extensão da lesão cardíaca. Portanto, faz-se necessário o incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias mais práticas e rápidas para o diagnóstico do IAM, com o objetivo de diminuir o tempo de execução e os custos do ensaio, sem perda da especificidade e sensibilidade dos métodos convencionais. Diferentes moléculas biológicas podem ser empregadas como elementos de biorreconhecimento em biossensor, tais como enzimas, receptores celulares, ácidos nucleicos e micro-organismos para reconhecer diferentes analitos em suas respectivas amostras (GRIESHABER *et al.*, 2008).

2.2 Biossensores

Biossensores, por definição, são dispositivos que têm a propriedade de detectar uma espécie química ou biológica (analito), qualitativamente ou quantitativamente (ROSATTO *et al.*, 2001), sendo composto por um elemento biológico e um transdutor

(Figura 3). O elemento biológico tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A resposta bioquímica desta interação, então, é convertida pelo transdutor num sinal elétrico passível de ser quantificado (LOUZADA, LUCCAS & MAGALHÃES, 2004; FERREIRA & YAMANAKA, 2006).

Figura 3 – Representação esquemática de um biossensor.



CLARK & LYONS (1962) demonstraram o primeiro biossensor desenvolvido para determinação da glicose. A tecnologia desse trabalho foi transferida e industrializada pela *Yellow Spring Instrument Company* levando ao lançamento comercial do primeiro biossensor de glicose em 1975. A partir daí, diversas formas de biossensores para glicose foram desenvolvidas (RICCI & PALLESCHI, 2005), assim como muitas outras tecnologias de dispositivos (ARYA, DATTA & MALHOTRA, 2008).

Os biossensores continuam se destacando como uma área atrativa e bastante promissora no mercado. Investimentos de aproximadamente 13 bilhões de dólares foram contabilizados em 2009, e até 2016 os investimentos estão projetados para ultrapassarem os 14 bilhões de dólares (TANG, 2010; THUSU, 2010). Na área acadêmica, em 2009, as publicações envolvendo biossensores ultrapassaram os 6.000 artigos. As previsões até 2016 sugerem que esta tendência de crescimento irá continuar com destaque para os biossensores do tipo pronto-atendimento (*point-of-care*) (THUSU, 2010). A tecnologia dos biossensores vem sendo desenvolvida para detecção de importantes biomoléculas com o objetivo de transmitir informações rápidas e precisas sobre amostras de interesse no campo da medicina, agricultura, segurança alimentar, bioprocessamento, monitoramento industrial e ambiental. A classificação dos

biossensores pode variar de acordo com o elemento biológico de reconhecimento e o tipo de transdutor empregado (LUONG, MALE & GLENNON, 2008). De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores podem ser classificados em: eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos) (WU, YAN & JU, 2007), eletromagnéticos (acústicos ou piezoelétricos - microbalança de cristal de quartzo, QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*) (PAVEY, HUNTER & PAUL, 2003), ópticos (por fluorescência ou luminescência – ressonância de plásmon de superfície, SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) (TANG et. al., 2006) e os calorimétricos (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002) (**Figura 3**). O transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias presentes na amostra a ser analisada. A escolha de um determinado transdutor não depende apenas do tipo elemento de reconhecimento selecionado, já que este determina quais variações das propriedades físico- químicas ocorreriam em função da interação, mas depende também de outros fatores como tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002).

2.2.1 Imunossensores

Os biossensores são denominados imunossensores quando anticorpos ou antígenos são utilizados como elementos de biorechecimento para seus analitos específicos (CONROY *et al.*, 2009). Os imunossensores podem monitorar as reações imunológicas na superfície sensora com alta confiabilidade devido à especificidade e seletividade da interação anticorpo-antígeno, sendo uma importante ferramenta analítica (CHEN *et al.*, 2009).

De acordo com o envolvimento de marcadores conjugados aos imunorreagentes, os imunossensores podem ser classificados como marcados e não-marcados (*label-free*). A maioria dos imunossensores marcados, descritos na literatura, exploram o princípio dos imunoensaios tipo competitivo e sanduíche utilizando enzimas, fluoróforos e nanopartículas metálicas e magnéticas como marcadores. Apesar de seletivos, os imunossensores marcados implicam em elevados custos operacionais, incluindo aumento das etapas de processamento da amostra. Já nos ensaios não marcados, a resposta do imunossensor é obtida diretamente após o evento de biorreconhecimento (RAPP, GRUHL & LÄNGE, 2010; QIU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Para

construção do imunossensor, é essencial a incorporação estável do elemento de reconhecimento biológico. Anticorpos ou antígenos, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o imunossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o analito alvo (CHEN & DONG, 2003). Uma característica desejável do método de imobilização escolhido é que ele resulte em um anticorpo imobilizado orientadamente, ou seja, com o mínimo de impedimento estérico, para interagir favoravelmente com seu antígeno alvo. Evidentemente, esta característica tem uma influência direta sobre o nível de sensibilidade do imunossensor (FOWLER *et al.*, 2008). Várias substâncias têm sido utilizadas como materiais para matriz de imobilização, tais como: polímeros, sol-gel, nanopartículas e nanotubos (SHI *et al.*, 2007).

2.3 Transdutores em imunossensores

De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores em imunossensores podem ser classificados em: eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos) (WU, YAN & JU, 2007), eletromagnéticos (microbalança de cristal de quartzo, QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*) (PAVEY, HUNTER & PAUL, 2003) e ópticos (ressonância de plasmon de superfície, SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) (TANG *et al.* 2006) (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002). O transdutor a ser utilizado, juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um analito ou produto específico, não respondendo a outras substâncias presentes na amostra a ser analisada. A escolha de um determinado transdutor não depende apenas do elemento de reconhecimento selecionado, já que este determina quais variações das propriedades físico-químicas ocorreriam em função da interação, mas também de outros fatores como tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002).

2.3.1 Transdutores Eletroquímicos

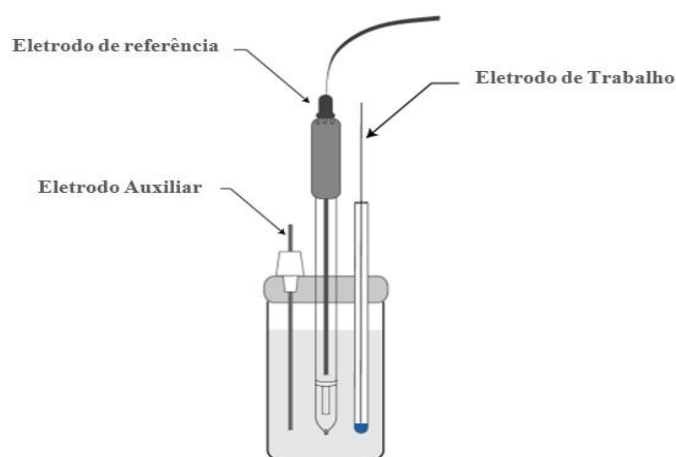
Recentemente, os imunossensores eletroquímicos vêm ganhando crescente atenção, uma vez que combinam a alta especificidade dos tradicionais métodos de imunoensaio, com os limites de detecção baixos e custo reduzido do sistema de medição

eletroquímica (HE *et al.*, 2009). Os transdutores eletroquímicos oferecerem vantagens como: simplicidade, rapidez na resposta, menor custo, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação de sensores portáteis (JIN *et al.*, 2006).

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

Em geral, os sistemas eletroquímicos são constituídos por um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de trabalho (**Figura 4**). Esses eletrodos são conectados a um potenciostato e imersos em uma célula contendo a solução da espécie eletroativa de interesse com um excesso de um eletrólito inerte (eletrólito suporte), responsável por garantir o controle difusional das espécies (GANDRA *et al.*, 2004). O eletrodo de referência, normalmente de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), mantém o potencial de trabalho estável. O eletrodo de trabalho funciona como elemento transdutor da reação bioquímica, enquanto o eletrodo auxiliar estabelece uma conexão com a solução eletrolítica (GRIESHABER *et al.*, 2008).

Figura 4 – Sistema eletroquímico constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar (fio de platina).



(Fonte: <http://web.mit.edu/kjhuang/www/Literature/Templates/PAA/NonJournal%20References/cell-types.pdf>)

2.3.2 Técnicas Eletroquímicas

A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo. A eletroquímica pode favorecer opções viáveis para mediar problemas na construção de novos métodos para o diagnóstico clínico. Uma das vantagens é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas, além do fácil controle de variáveis que combinadas de formas diversas levam a técnicas eletroquímicas particulares, tais como: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de pulso diferencial (VPD) (BRETT *et al.*, 1996). Dentre estas, a voltametria cíclica teve destaque neste trabalho.

2.3.3 Voltametria Cíclica

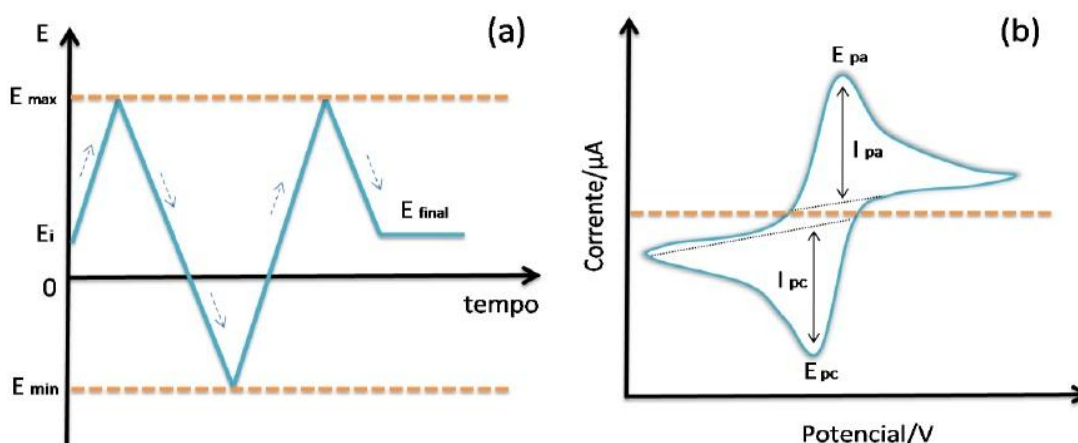
A VC um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre o analito são mensuradas através de variações de corrente resultantes de reações de redução e oxidação durante a aplicação de uma diferença de potencial sobre o eletrodo de trabalho. Nesse processo, uma corrente capacitiva é gerada,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

A VC é uma das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A resposta em corrente, neste método, pode ser obtida quando o eletrodo de trabalho é submetido a uma onda triangular de potencial, no qual o mesmo é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até um final. Como resultado, é gerado um gráfico de corrente em função da variação do potencial, denominado voltamograma cíclico (**Figura 5**). Os principais parâmetros analisados no voltamograma cíclico são: os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) (HOLLER, SKOOG & CROUCH,

2009). Esses dados oferecem informações importantes quanto à reversibilidade da transferência de elétrons. Para uma reação reversível, as I_{pa} e I_{pc} são aproximadamente iguais em valor absoluto, a diferença entre os E_p é aproximadamente 59 mV e E_p é independente da velocidade de varredura. Já nos sistemas irreversíveis observa-se uma completa ausência de picos de oxidação e redução reversos e deslocamentos do E_p em relação à velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

A VC pode ser utilizada para caracterização de estudos de modificação da superfície sensora, detalhando importantes informações do sistema, tais como potencial de oxidação e redução da espécie, número de elétrons transferidos, reversibilidade da reação, coeficiente de difusão, etc (BRETT & BRETT, 1993).

Figura 5 – Representação gráfica da técnica de VC: (a) variação linear do potencial vs. tempo e (b) voltamograma cíclico.



(Fonte: BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006)

2.4 Modificação Eletródica

O desenvolvimento de técnicas de modificação da superfície eletródica tem sido importante por aumentar a estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor (FREIRE, DURAN & KUBOTA, 2001; WANG *et al.*, 2002). As modificações superficiais de eletrodos visam pré-estabelecer e controlar a reatividade da interface para imobilização de antígenos ou anticorpos, originando frequentemente respostas mais confiáveis do que

na ausência do modificador (VENDRAME, 2004). Na modificação eletródica, a superfície do eletrodo pode ser propositadamente alterada por adsorção irreversível direta, por ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, por recobrimento com filmes poliméricos e nanomateriais (PEREIRA, SANTOS & KUBOTA, 2002).

2.4.1 Polímeros

Polímeros são compostos que possuem alta massa molar formado pela repetição de muitas unidades químicas. Os polímeros podem ser orgânicos ou inorgânicos, mas os mais estudados e importantes comercialmente são os orgânicos. Existe uma diferença entre macromolécula e polímero que consiste no fato de que a alta molaridade dos polímeros é devido à repetição de unidades estruturais simples (poli “muitos”, meros “partes”) e na macromolécula é consequência da complexidade molecular, como as macromoléculas presentes nos organismos vivos. Os monômeros são substâncias que dão origem aos polímeros por meio de reação química (AKCELRUD, 2007).

Os polímeros tem atraído muito interesse como matriz para imobilização de biomoléculas. Estes podem servir como intermediários na interação entre o bioreceptor e o eletrodo, bem como auxiliar na transdução do sinal elétrico com o objetivo de melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção de biossensores em diversas áreas, desde o diagnóstico de doenças até determinação de contaminantes em água. Dessa forma, muitas revisões já foram publicadas sobre o uso de polímeros na construção de biossensores (GERARD, 2002; VIDAL, 2003; BOROLE, 2006; ARREDONDO, 2012; PAROLO, 2013).

Além disso, os grupos funcionalizados dos polímeros permitem que essa imobilização seja feita de forma simples e específica na superfície do eletrodo (COSNIER, 2003). Dessa forma, é possível controlar a distribuição espacial das espécies imobilizadas, assim como a espessura do filme, pela modificação nas propriedades do polímero (GERARD, 2002; DEEPSHIKHA, 2011). Portanto, o desenvolvimento de tecnologias nesse campo de conhecimento depende da compreensão das interações a nível molecular entre a matriz polimérica e a espécie biológica (OLIVEIRA, 2013).

2.4.1 Polipirrol

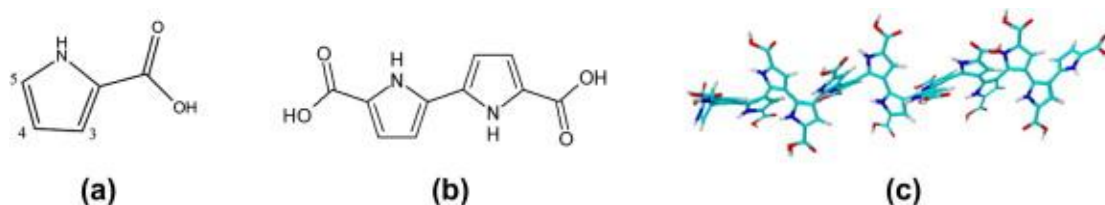
Sintetizado pela primeira vez por A. ANGELI e L. ALESSANDRO (1996), o polipirrol (PPI) foi fruto da oxidação química do pirrol (Pi). Porém, o primeiro artigo publicado que descreveu sua síntese e as propriedades condutoras desse polímero foi no ano de 1968. O PPI é um dos polímeros mais conhecidos, além de ser tema de diversos estudos, devido sua alta condutividade elétrica, boa estabilidade química, devido ao seu baixo potencial de oxidação e versatilidade de síntese. Adicionalmente o PPI é um dos polímeros mais utilizados em aplicações industriais devido sua longa estabilidade e sua condutividade, e a possibilidade de formação de compósitos com propriedades mecânicas excelentes (SAUNDERS, 1995).

O PPI pode ser obtido em solução pelo uso de um oxidante químico, através da polimerização química, ou por oxidação em um substrato condutor, na polimerização eletroquímica (NALWA, 1997). Na síntese eletroquímica, conhecida também como eletropolimerização, pode se ter um maior controle dos parâmetros de produção dos polímeros, podendo depositar filmes finos com espessuras na faixa entre 5 a 5000 nm. Nessa técnica, ocorre inicialmente a oxidação do monômero Pi, o que leva a formação de um intermediário cátion-radical, pela aplicação de uma diferença de potencial. Nesta etapa, contra-íons são incorporados ao cátion-radical para neutralizar a carga do sistema (GUIMARD, 2007; SADKI, 2000). Em seguida, ocorre o acoplamento de dois cátions-radicais, e através de uma transferência de carga, acontece a eliminação de dois prótons com a formação de um dímero neutro. Essa propagação ocorre na mesma sequência: oxidação, acoplamento e liberação de prótons (WALLACE, 1985). Desse modo, as cadeias de oligômeros vão sendo formadas e posteriormente as cadeias poliméricas, de forma que estas cheguem ao ponto de se tornarem “pesadas demais” e insolúveis no meio do eletrólito, precipitando sobre a superfície do eletrodo (SADKI, 2000).

Muitos autores buscam funcionalizar a estrutura do anel heterocíclico do pirrol, usando seus derivados e copolímeros, na intenção de usar esses grupos químicos na imobilização do biorreceptor na matriz polimérica. Em meio aos derivados do Pi funcionalizados, encontra-se o Pi-2-ácido carboxílico (Pi-2-COOH) que vem se destacando como material eletroativo com interessantes propriedades para utilização em biossensores (**Figura 6**). FOSCHINI e colaboradores (2013), desenvolveram estudos demonstrando experimentalmente a influência do solvente empregado na solução dos monômeros de Pi-2-COOH, sobre as propriedades dos filmes produzidos por

voltametria cíclica. Entretanto, temas como o mecanismo de eletropolimerização, propriedades eletrônicas e estruturais, graus de conjugação de espécies intermediárias formadas após a oxidação do Pi-2-COOH até esse momento, não foram abordadas.

Figura 6 – Estrutura química do (a) monômero de Pi-2-COOH, (b) dímero e (c) oligômeros com 16 anéis conjugados após a eletropolimerização do Pi-2-COOH.



(Fonte: FOSCHINI *et al.*, 2013)

2.4.2 Nanotubos de Haloisita

Nanomateriais diversos, tais como nanopartículas, nanofios, nanotubos, e nanoesferas, têm sido utilizados para confecção de biossensores e imunossensores. Os dispositivos baseados em nanomateriais apresentam bom desempenho, pois podem oferecer uma nova oportunidade para amplificar o sinal da interação antígeno-anticorpo em imunossensores, mediante incorporação de moléculas imunorreativas aos nanomateriais (FENG *et al.*, 2003).

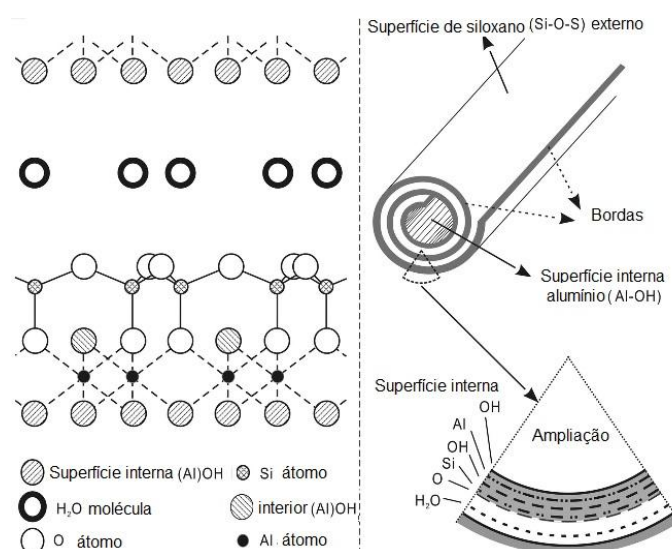
Um ramo da nanotecnologia que se encontra em desenvolvimento é principalmente focada em nanomateriais à base de carbono e inorgânicos, como nanotubos de carbono, grafeno e nanofios de metal (IIJIMA, 1991; TENNE *et al.*, 1992; ENDO *et al.*, 1996; DRESSELHAUS *et al.*, 2001). Porém, outros sistemas que nanoestruturados derivados de aluminossilicatos estão sendo investigados. Essas estruturas tem ganhado destaque na literatura e surgem como um campo emergente na pesquisa, podendo ser usadas como nanorreator de catalisadores seletivos, adsorvente, encapsulamento, condutor iônico e suporte para imobilização (NAKAGAKI & WYPYCH, 2007; KUC & HEINE, 2009).

Haloisita (*halloysite*), um argilomineral do grupo da caulinita, é um nanomaterial economicamente viável, que ocorre amplamente em solos de regiões tropicais e subtropicais e rochas desgastadas, sendo formado pelo intemperismo de muitos tipos de rochas. As partículas de haloisita podem adotar uma variedade de

morfologias (ex.: tubular, esférica, pseudo-esférica, prismática, etc.), conforme as condições de cristalização e ocorrências geológicas, dentre as quais a forma tubular denominada de nanotubo de haloisita (*halloysite nanotube* – NTH) é a mais encontrada (NAKAGAKI & WYPYCH, 2007; LVOV *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Apenas se conhece a ocorrência natural dos NTHs, sendo que este nanomaterial ainda não foi sintetizado em laboratório (WHITE *et al.*, 2012). Atualmente, o maior país exportador de NTH é a Nova Zelândia, mas existem depósitos expressivos também em outros países, como por exemplo: Austrália, França, Marrocos, Filipinas, Coréia do Sul, China, Japão, USA, Guiana, México e Brasil (JOUSSEIN *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2007).

Os NTHs apresentam na configuração de folha octaédrica gibsita ($\text{Al}(\text{OH})_3$), modificado por grupos siloxano na superfície externa. Os tubos de haloisita possuem tamanho que varia de 500-1000 nm de comprimento, e diâmetro interno de 15-100 nm dependendo do substrato. Os NTHs possuem duas faces diferentes, sendo uma composta por uma superfície de silicato tetraédrico Si-O-Si, enquanto a outra superfície tem uma camada octaédrica gibsita $\text{Al}(\text{OH})_3$ (**Figura 7**). As cargas que os NTHs possuem dentro e fora, estão relacionadas com sua estrutura e propriedades de adsorção (GUIMARÃES *et al.*, 2010), sendo a carga da parede interna do tubo carregada positivamente, enquanto que a superfície exterior tem uma carga negativa (LVOV *et al.*, 2008).

Figura 7 – Representações esquemáticas da (A) estrutura cristalina da haloisita (10 Å) e da (B) estrutura de um NTH.



(Fonte: YUAN *et al.*, 2008)

Em virtude do expressivo progresso alcançado através da nanotecnologia, os NTHS, recentemente, têm recebido atenção de pesquisadores, sendo investigados como materiais promissores para aplicações em diversas áreas, tais como na formação de nanocompósitos com matrizes poliméricas (YANG *et al.*, 2010), imobilização de enzimas (SUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011) e complexos metálicos (NAKAGAKI e WYPYCH, 2007), liberação controlada de fármacos (LVOV *et al.*, 2008), remoção de metais (WANG *et al.*, 2010), suporte para nanopartículas metálicas (LIU e ZHAO, 2009;) e construção de sensores e biossensores (SUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma plataforma sensora nanoestruturada empregando pirrol carboxílico e nanotubos de haloista para detecção de níveis clínicos da cTnT, um importante marcador do IAM.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e otimizar o método de eletropolimerização eletroquímica do Pi-2-COOH;
- Desenvolver uma plataforma sensora empregando Pi-2-COOH e NTHs-NH₂, visando a aplicação em imunoenaios eletroquímicos;
- Realizar testes de imobilização dos anticorpos anti-cTnT, para a avaliação da funcionalidade do filme formado;
- Estabelecer as respostas do imunossensor para determinação eletroquímica da cTnT, empregando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada ;
- Caracterizar o imunossensor proposto para cTnT quanto à sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade operacional;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Troponina cardíaca humana (cTnT) e anticorpos monoclonais anti-troponina T cardíaca humana (anti-cTnT) foram adquiridos da Calbiochem (EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), acetonitrilina (ACN), glutaraldeído (50 % v/v) (Glut), *N*-hidroxi succinimida (NHS), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Pirrol-2-ácido carboxílico (Pi-2-COOH) e nanotubos de haloisita (NTHs-NH₂) modificados com aminopropiltrietoxisilano (0,5-5% wt) e octadecilamina (15-35% wt) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Perclorato de lítio (LiClO₄) e clorofórmio foram obtidos da VETEC (Brasil).

O tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,4) foi utilizado em todos os experimentos para diluição das amostras biológicas. Este foi preparado dissolvendo-se 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,24 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) e 1,44 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄), todos obtidos da VETEC (Brasil), em 1000 mL de água deionizada.

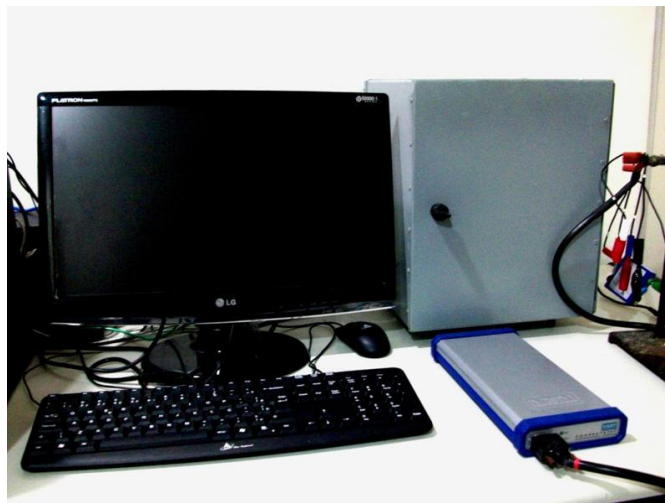
Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada ultra pura obtida através de sistema Millipore Milli-Q® (EUA) com resistividade maior que 18 MΩ/cm. Os reagentes químicos utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico.

4.2 Equipamentos

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato modelo Ivium Compact Stat (Ivium Technologies, Holanda) conectado a um microcomputador utilizando o *software* Ivium Soft, para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados (**Figura 8**). Para tais experimentos, foi empregada uma célula eletroquímica convencional de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade de 20 mL e tampa de policloreto de vinila. O sistema eletroquímico foi composto por: um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com área de 0,7 mm² como eletrodo de trabalho; um eletrodo helicoidal de fio de platina como auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl, com solução

interna de KCl saturado (3,0 M) como referência, sendo todos adquiridos da Microquímica (Brasil).

Figura 8 – Potenciostato modelo Ivium Compact Stat acoplado ao microcomputador.



4.3 Preparação do eletrodo de trabalho

Previamente a sua utilização em ensaios eletroquímicos, o ECV foi submetido a um procedimento mecânico de limpeza. Esta etapa consistiu no polimento da superfície do ECV com um tecido aveludado embebido em alumina de granulometria de 0,5 μm durante 3 minutos. Para remoção de partículas de alumina e outros contaminantes, o ECV foi submetido a duas agitações, em banho ultrassônico por 1 minuto, em água ultrapura e etanol. Análises por VC em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0,005 M) preparado em KCl (0,1M) foram realizadas após o procedimento de polimento do ECV para caracterização do perfil dos picos redox do eletrodo. Esses voltamogramas foram então utilizados como linha de base para as leituras subsequentes, verificando assim as modificações da interface sensora através das variações das correntes de oxidação e redução.

4.4 Eletropolimerização do Pi-2-COOH

Para eletropolimerização do Pi-2-COOH a técnica de VC foi selecionada. Em uma célula eletroquímica contendo a solução de monômeros de Pi-2-COOH, o ECV

previamente limpo, foi submetido a 20 ciclos voltamétricos na faixa de potencial de -0,1 a 1,0 V vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.), sob velocidade de varredura de 20 mV/s para eletrossíntese do polímero. A solução monomérica de Pi-2-COOH (0,01M) foi preparada em ACN contendo 0,1 M de LiClO₄.

Outras metodologias de eletropolimerização também foram realizadas:

- a) Eletropolimerização do Pi-2-COOH (0,01 M) em uma solução aquosa de H₂SO₄ (0,5 M) durante 20 ciclos voltamétricos na faixa de potencial de 0 a 1 V vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.), a taxa de varredura de 20 mV/s (JANMANEE, 2012);
- b) Eletropolimerização do Pi-2-COOH (0,01 M) em uma solução aquosa de KCl (0,1 M) durante 20 ciclos voltamétricos na faixa de potencial de -0,8 a 0,8 V vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.) a velocidade de varredura de 20 mV/s (TRUONG, 2011).

4.5 Construção do filme de Pi-2-COOH/ NTHs-NH₂

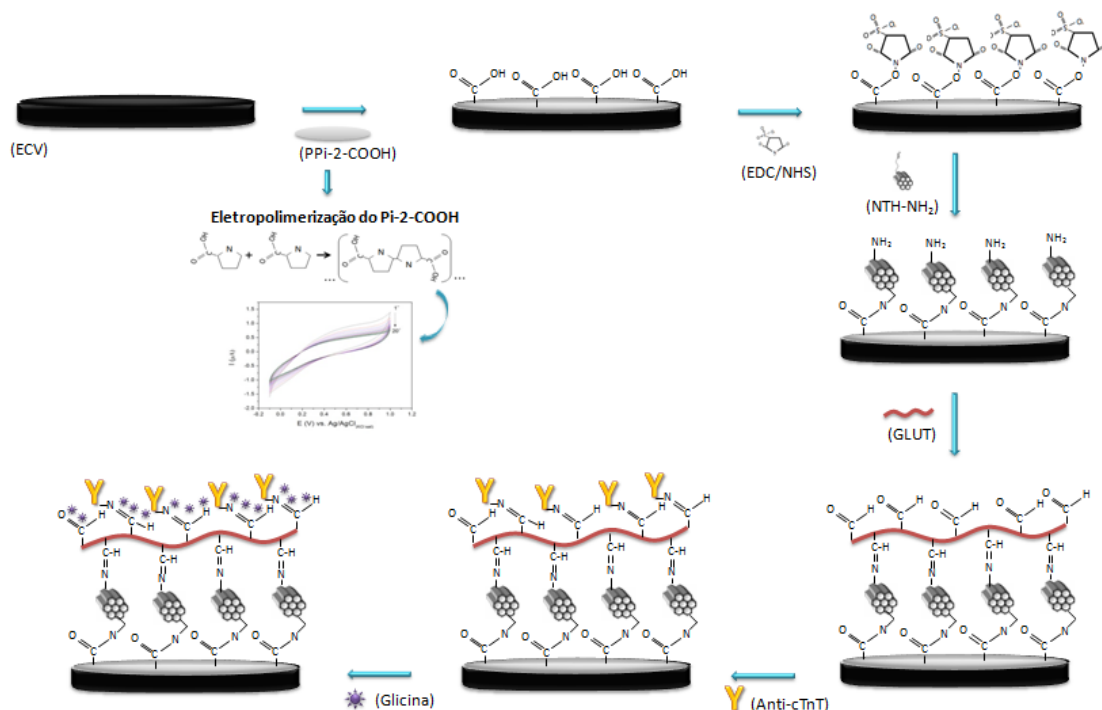
O ECV eletropolimerizado com P Pi-2-COOH foi modificado com filme de NTHs-NH₂ preparado em clorofórmio. Os grupamentos carboxílicos terminais do filme de Pi-2-COOH foram previamente ativados com uma solução de EDC (0,002 M) e NHS (0,005 M) preparada em água deionizada durante 60 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, 3 μL da solução de NTHs- NH₂ em clorofórmio foi depositado sobre o ECV. O eletrodo foi mantido por 10 minutos em uma estufa ajustada para temperatura de 40°C para evaporação do solvente. Curvas de concentração do Pi-2-COOH e de NTHs-NH₂ foram obtidas para otimização da plataforma sensora.

4.6 Imobilização dos anticorpos anti-cTnT

Para imobilização do anti-cTnT a superfície do ECV modificada com o Pi-2-COOH/ NTHs-NH₂ foi incubada com uma solução aquosa de GLUT (5 %) durante 60 minutos. Em seguida, uma alíquota de 5 μL da solução de anticorpos anti-cTnT foi pipetada sobre o ECV e mantida durante 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Os sítios livres não-específicos do anti-cTnT foram bloqueados utilizando uma solução de glicina (0,005M) durante 30 minutos. Após esta etapa, os ECVs foram incubados com soluções de diferentes concentrações de cTnT diluídas em PBS (pH 7,4; 0,01 M)

(Figura 9). Entre as etapas do imunoensaio a superfície eletródica foi lavada cuidadosamente com tampão PBS (pH 7,4; 0,01 M).

Figura 9 – Etapas de construção do imunossensor.



4.7 Imunoensaio eletroquímico

Para caracterização das etapas de modificação do ECV análises por VC foram realizadas em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) preparado em KCl (100 mM). Os voltamogramas do ECV foram obtidos na faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V vs. Ag/AgCl (KCl Sat.), a velocidade de varredura de 100 mV/s. A interação antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo foi monitorada em tempo real, utilizando a técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada (SWV). O pulso diferencial foram registrados de 0 V a 0,6 V vs. Ag/AgCl (KCl Sat.), com amplitude de pulso de 10 mV, largura de 10 ms e potencial de 100 mV/s. A resposta analítica para cTnT foi obtida pela diferença entre a altura dos picos de corrente (ΔI) da VPD do ECV com a cTnT em relação ao branco, ou seja, antes da incubação cTnT.

4.8 Otimização dos parâmetros experimentais

4.8.1 Influência da velocidade de varredura na eletropolimerização do Pi-2-COOH

A taxa de varredura do processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH foi investigada para otimizar as condições de formação do filme polimérico em relação ao consumo de monômeros na interface. O ECV limpo foi submetido a diferentes taxas de eletropolimerização e o perfil voltamétrico em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M) preparado em KCl (0,1M) foi subsequentemente registrado para avaliação da polimerização do Pi-2-COOH.

4.8.2 Estudo de estabilidade do filme de Pi-2-COOH/NTH

A estabilidade do filme de Pi-2-COOH e NTHs-NH₂ foi estudada, realizando-se 20 sucessivas varreduras do mesmo eletrodo, na janela de potencial -0,2 a 0,7 V vs. Ag/AgCl (KCl Sat.), sob velocidade de varredura de 100 mV/s, em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (0,005 M) preparada em KCl (0,1 M). A estabilidade do Pi-2-COOH/NTH no ECV foi avaliado a partir do conhecimento do coeficiente de variação (CV) obtido entre os experimentos. Como controle, foram usados ECV apenas com o filme de NHT;.

4.8.3 Influência da velocidade de varredura

Para investigar os mecanismos eletroquímicos envolvidos na resposta analítica do imunossensor, o ECV/Pi-2-COOH/ NTHs-NH₂ foi submetido análises por VC a diferentes velocidades de varredura (10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mV/s), em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M) preparada em KCl (0,1M). O comportamento eletroquímico do filme nanoestruturado foi avaliado através da relação dos I_{pa} e I_{pc} vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

4.8.4 Influência da concentração de anticorpo e tempo de imunorreação

A influência da concentração dos anticorpos anti-cTnT sobre o desempenho do imunossensor foi investigado. Neste estudo, o ECV/Pi-2-COOH/ NTHs-NH₂/GLUT foi incubados durante 60 minutos com anticorpos anti-cTnT a diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 7,5 e 10 µg/mL). Os VCs foram registrados na mesma faixa de potencial dos estudos anteriores e conduzido em K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M). Para analisar o efeito do tempo de interação antígeno-anticorpo na interface sensora, o ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/Glut/Glicina foi incubado com 0,5 ng/mL da cTnT durante 10, 20, 30, 40, 50, 60 min. Em seguida, os eletrodos foram submetidos a análises por VC.

4.8.5 Curva de calibração

A curva de calibração do imunossensor proposto para as diferentes concentrações de cTnT foi verificada utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). Para tais experimentos, sucessivas adições de amostras de cTnT, preparadas em tampão PBS (0,01M, pH 7,4), foram pipetadas sobre a superfície do ECV/Pi-2-COOH/ NTHs-NH₂/GLUT/Glicina e mantidas durante o tempo ótimo de incubação. As medidas de corrente do ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/GLUT/Glicina foram consideradas como controle no estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

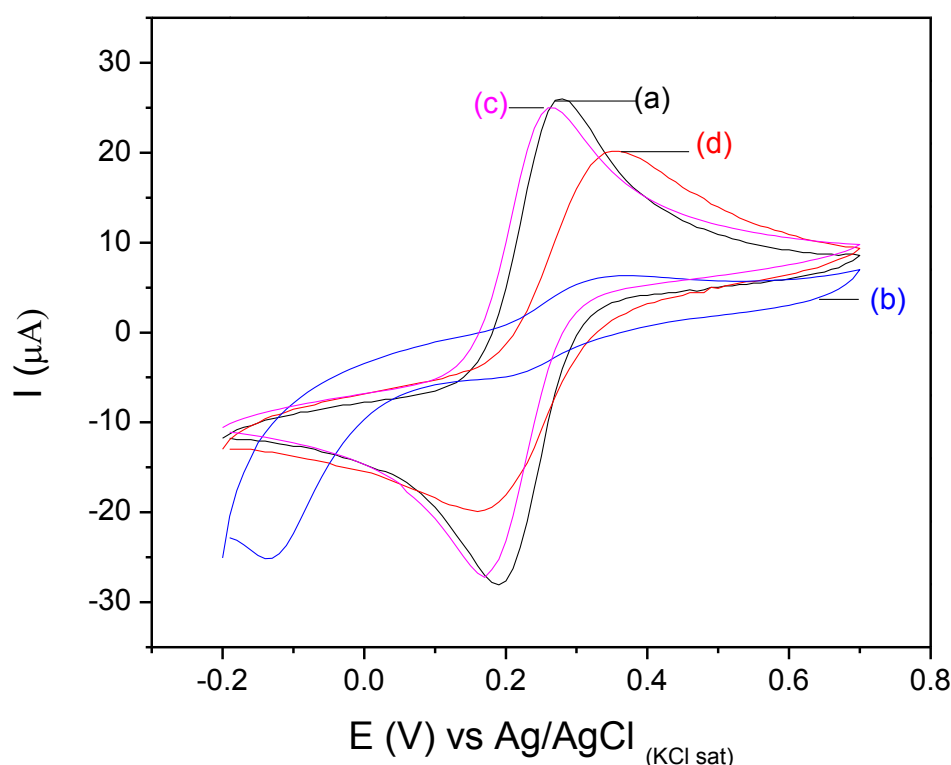
5.1 Caracterização da eletropolimerização do Pi-2-COOH

As propriedades dos filmes de Pi e seus derivados são dependentes de sua microestrutura, as quais estão relacionadas ao grau de ordenação da cadeia. Estudos desenvolvidos por LAKHDAR & MAYR (2011) sobre a síntese eletroquímica do PPI demonstraram que a organização da cadeia polimérica é determinada principalmente pela escolha do contra-íon e condições de síntese. O contra-íon atua para manter a neutralidade de carga do sistema. No caso do Pi, cuja eletrossíntese é iniciada com a oxidação dos monômeros gerando um composto catiônico. É necessário a incorporação de um contra-íon aniônico, equilibrando as cargas para o desencadeamento da polimerização (SADKI *et al.*, 2000). De maneira geral, os contra-íons mais estabelecidos na literatura para a síntese do Pi são os sais com aniões fluoratos, percloratos, sulfonatos e cloretos (TAMM *et al.*, 2002). Entretanto, poucos estudos têm investigado a ação destes contra-íons no processo de eletropolimerização de derivados do Pi.

Com o objetivo de padronizar o método de eletropolimerização do Pi-2-COOH, diferentes metodologias de eletropolimerização foram investigadas, nas quais os contra-íons H_2SO_4 , KCl e LiClO_4 foram utilizados em condições experimentais específicas. O gráfico comparativo dos VCs em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0,005 M) do ECV limpo e eletropolimerizado com as diferentes metodologias pode ser analisado na **Figura 10**.

Na metodologia empregando o H_2SO_4 como contra-íon, observa-se uma irreversibilidade dos picos redox com a formação de um filme isolante (**Figura 10 (b)**). O ECV quando eletropolimerizado em KCl apresentou um suave deslocamento de potencial e uma redução das correntes anódica e catódica em relação ao eletrodo não modificado (**Figura 10 (c)**). Estes dados provavelmente indicam a formação de um filme fino de Pi-2-COOH, devido ao pouco consumo de monômeros durante a polimerização na interface sensora. O VC do estudo empregando o LiClO_4 como contra-íon apresentou uma redução maior dos valores de corrente quando comparado ao contra-íon KCl, exibindo picos redox definidos e reversíveis (**Figura 10 (d)**). O perfil eletroquímico obtido demonstra que o contra-íon LiClO_4 influenciou na resposta do sensor, contribuindo para a formação de um filme isolante mais uniforme.

Figura 10 – Influência dos contra-íons empregados no processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH: (a) ECV limpo, (b) ECV eletropolimerizado em H_2SO_4 (0,5 M), (c) ECV eletropolimerizado em KCl (0,1 M) e (d) ECV eletropolimerizado em LiClO_4 (0,1 M). Voltamogramas obtidos em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M) a velocidade de varredura de 100 mV/s.



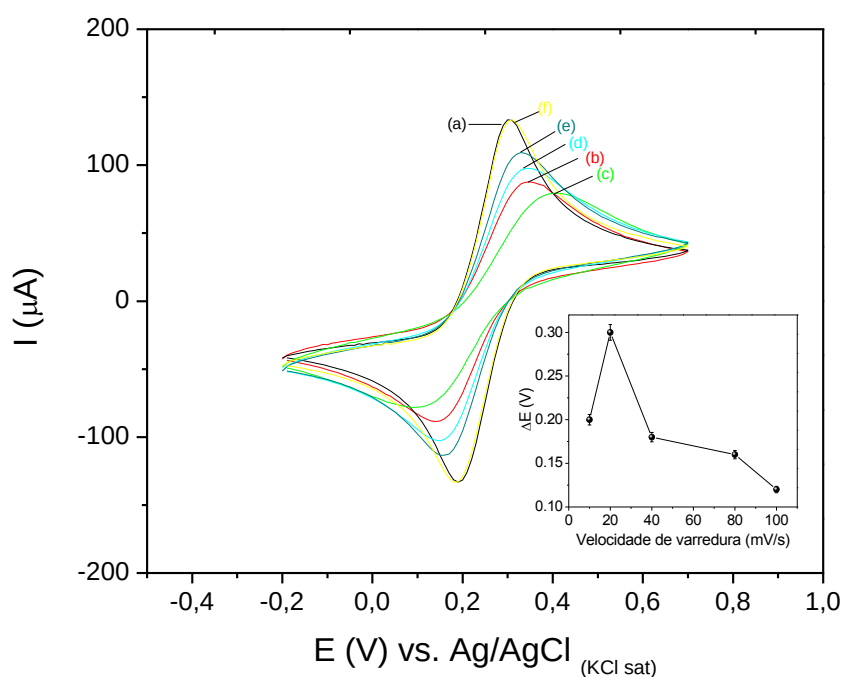
A influência da velocidade de varredura sobre a eletropolimerização do Pi-2-COOH no ECV foi analisada para padronização da construção do filme polimérico. Para estes ensaios, o ECV limpo foi imerso em uma solução de 0,01 M de Pi-2-COOH e 0,1 M de LiClO_4 , ambas preparadas em ACN, e submetido a 20 ciclos voltamétricos sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 40, 80 e 100 mV/s). O perfil eletroquímico dos Ipa e Ipc do ECV eletropolimerizado em relação às velocidades de varredura de eletropolimerização pode ser observado na **Figura 11**.

As variações de corrente nos resultados obtidos demonstram que a quantidade de Pi-2-COOH eletropolimerizado na superfície do ECV foi inversamente proporcional à velocidade de varredura, ou seja, com o aumento da velocidade de varredura há uma diminuição da taxa de eletropolimerização do monômero. Esta relação pode ser evidenciada comparando os voltamogramas do ECV limpo e eletropolimerizado sob os

maiores valores de velocidade, nos quais houve pouca variação de corrente do eletrodo eletropolimerizado em relação ao eletrodo não modificado. Reduzindo a taxa de velocidade de varredura observa-se a formação de um filme eletroinativo, ou seja, característico de um polímero isolante sobre a superfície do eletrodo. Assim, os resultados indicam que o processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH é controlado pela difusão de elétrons durante o consumo de monômeros na interface sensora.

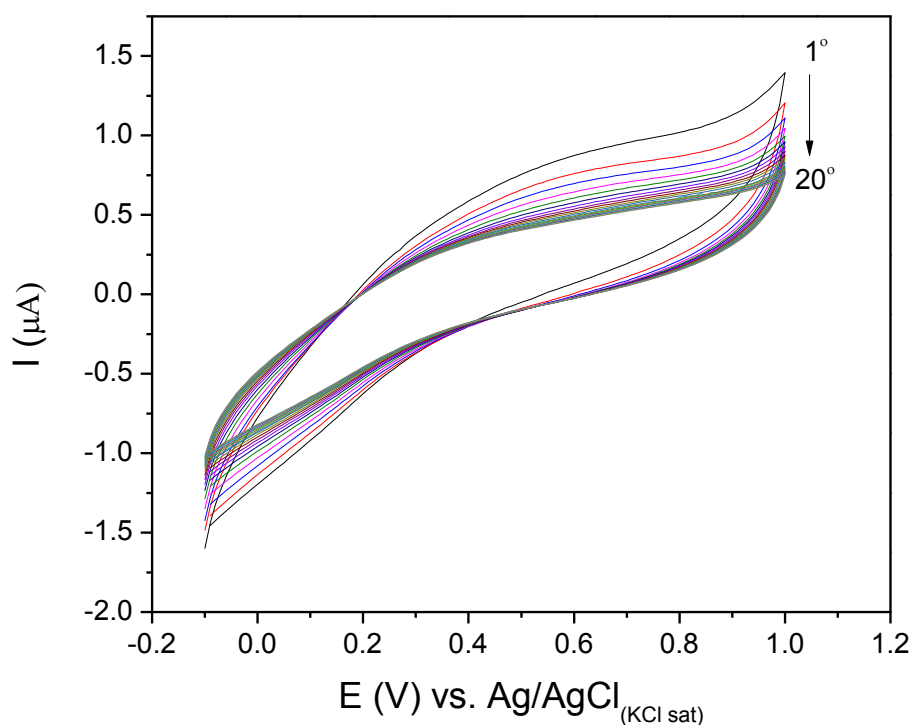
A diferença entre E_{p_a} e E_{p_c} oferece informações importantes sobre a formação do filme polimérico na superfície sensora. Os valores de ΔE_p ($\Delta E_p = E_{p_a} - E_{p_c}$) geralmente aumentam com a quantidade de polímero eletropolimerizado, uma vez que, nestas condições, há uma tendência à redução da transferência de elétrons, exibindo uma maior separação dos picos anódicos e catódicos (RIBEIRO et al., 2006). Os ECVs apresentaram um valor máximo de ΔE quando a taxa de varredura de eletropolimerização do Pi-2-COOH de 20 mV/s foi empregada (**Figura 11, inset**).

Figura 11 – Influência da taxa de velocidade de varredura no processo de eletropolimerização e construção do filme de Pi-2-COOH: (a) ECV limpo, (b) ECV eletropolimerizado a 10 mV/s, (c) ECV eletropolimerizado a 20 mV/s, (d) ECV eletropolimerizado a 40 mV/s, (e) ECV eletropolimerizado a 80 mV/s e (f) ECV eletropolimerizado a 100 mV/s. *Inset*: Relação entre os valores de ΔE_p e velocidade de varredura de eletropolimerização. VCs realizados em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 100 mV/s.



Os VCs na **Figura 12** apresentam o perfil eletroquímico da eletropolimerização do Pi-2-COOH (0,01 M) em perclorato de lítio (0,1M) preparado em ACN durante 20 ciclos, sob velocidade de varredura de 20 mV/s. Durante as sucessivas varreduras observa-se uma redução dos valores de corrente dos voltamogramas do ECV, indicando uma queda na concentração do Pi-2-COOH devido ao consumo de monômeros na interface sensora e formação de dímeros e espécies oligoméricas até atingirem um tamanho crítico.

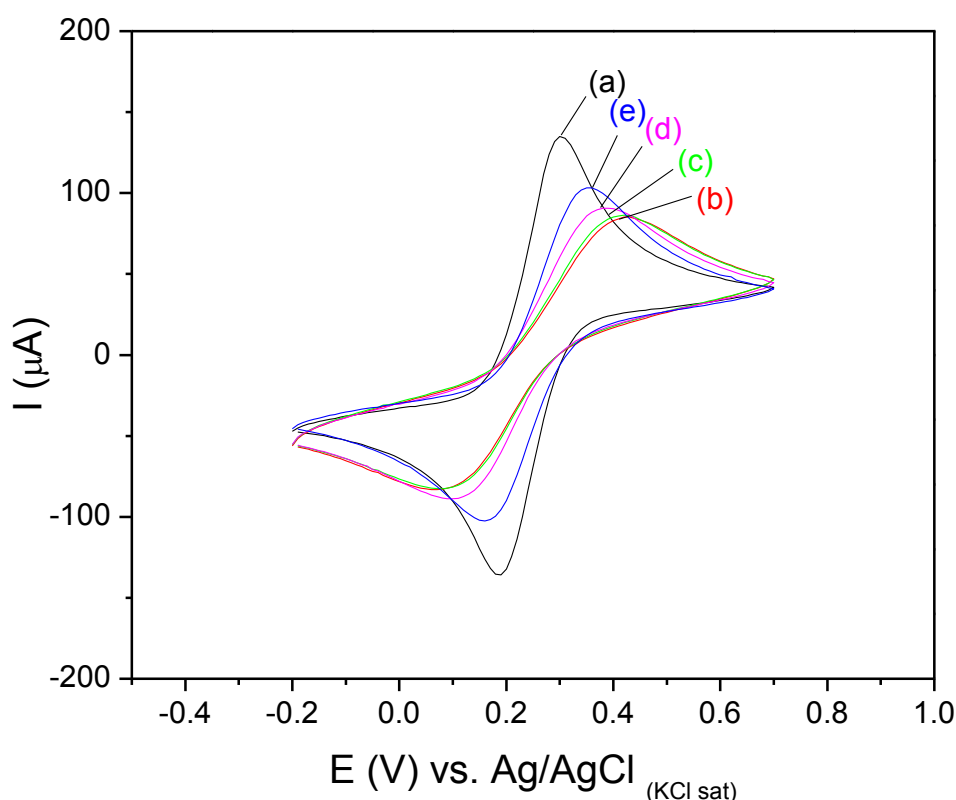
Figura 12 – Perfil eletroquímico do processo de eletropolimerização do Pi-2-COOH (0,01 M) durante 20 ciclos voltamétricos em solução de 0,1 M de LiClO₄ preparada em ACN, sob velocidade de varredura de 20 mV/s.



Após a caracterização eletroquímica da eletropolimerização do filme de Pi-2-COOH, um estudo de concentração do monômero foi realizado. Diferentes soluções de Pi-2-COOH nas concentrações de 0,001, 0,01, 0,02 e 0,03 M foram eletropolimerizadas sobre o ECV limpo. Os VCs dos ECVs nas concentrações específicas dos monômeros em relação ao eletrodo limpo podem ser visualizados na **Figura 13**. Os valores em I_{p_a} e I_{p_c} exibiram uma resposta máxima na concentração de 0,01 M. O eletrodo eletropolimerizado em concentrações acima de 0,01 M apresentou uma redução da taxa

de monômero eletropolimerizado, indicando uma saturação do sistema para formação do filme de Pi-2-COOH. Assim, a concentração de 0,01 M foi adotada como ótima para os estudos subsequentes.

Figura 13 – VCs do ECVs modificado com diferentes concentrações de Pi-2-COOH: **(a)** ECV limpo, **(b)** ECV/Pi-2-COOH 0,001 M, **(c)** ECV/Pi-2-COOH 0,01 M, **(d)** ECV/Pi-2-COOH 0,02 M e **(e)** ECV/Pi-2-COOH 0,03 M. VCs realizados em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M) preparada em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 100 mV/s.



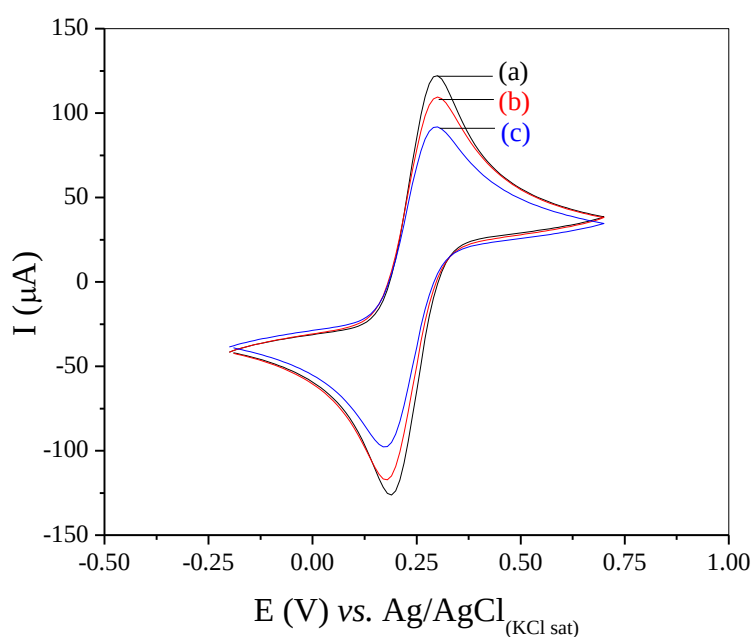
5.2 Construção do filme de Pi-2-COOH/NTH-NH₂

Os nanomateriais derivados da haloisita podem ser facilmente intercalados em sua estrutura cristalina com moléculas de água, bem como outros compostos orgânicos e inorgânicos, tais como formamida, etilenoglicol, dentre outros (DEEPAK & AGRAWAL, 2012). Estudos desenvolvidos por HAROOSH e colaboradores (2011) demonstram que a intercalação desses solventes pode influenciar no espaçamento entre os tubos, no diâmetro do nanomineral e na condutividade do mesmo. Neste trabalho, o clorofórmio foi escolhido para dispersão do NTH-NH₂ e obtenção de filmes

nanoestruturados sobre a superfície de ECVs. O perfil eletroquímico do estudo de preparo da haloisita em função do seu dispersante pode ser observado na **Figura 14**. Os VCs do ECV limpo (**Figura 14 (a)**) e modificado apenas com clorofórmio (**Figura 14 (b)**) foram utilizados como controles para analisar a influência do filme de NTHs-NH₂ sobre o ECV.

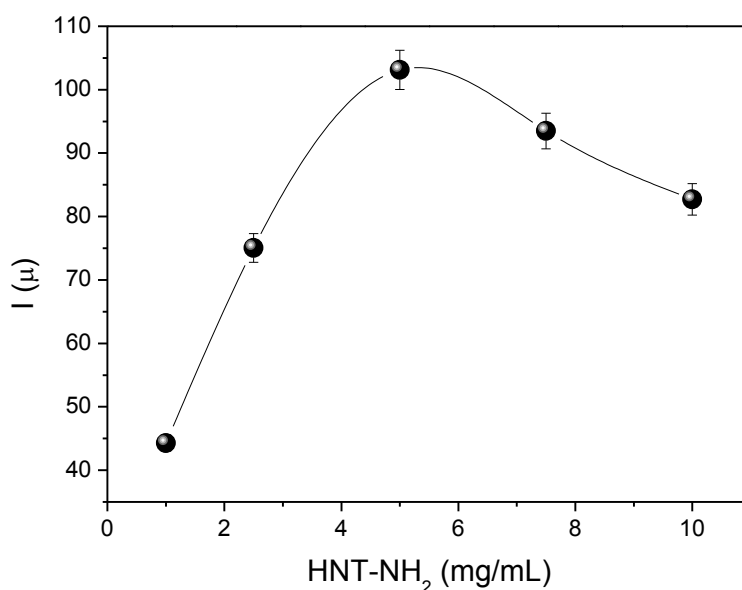
A influência do filme de NTHs-NH₂ em clorofórmio (5 mg/mL) sobre a resposta eletroquímica do ECV (**Figura 14 (c)**) revelou uma redução acentuada dos valores dos picos redox quando comparada aos voltamogramas anteriores. Estes dados estão relacionados à formação de um filme resistivo na interface sensora associado à natureza semicondutora do nanomaterial, como descrito por CAO *et al.* (2012) no desenvolvimento de nanocompósitos de NTH conjugados a nanopartículas metálicas. Assim, o solvente escolhido como dispersante dos NTHs-NH₂ para o preparo do filme teve pouca interferência na obtenção do perfil eletroquímico característico do nanomaterial.

Figura 14 – VCs da influência do filme de NTHs-NH₂ em clorofórmio sobre o perfil eletroquímico do ECV: (a) ECV limpo, (b) ECV modificado com clorofórmio e (c) ECV modificado um filme de NTH-NH₂ (5 mg/mL) preparado em clorofórmio. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.



Para otimização da construção da plataforma sensora, a concentração dos NTHs-NH₂ em relação ao filme de Pi-2-COOH foi avaliada. Neste ensaio, o ECV previamente eletropolimerizado com Pi-2-COOH (0,01 M) e ativado com EDC/NHS foi incubado durante 10 minutos com diferentes concentrações dos nanotubos (1 a 10 mg/mL). Os valores de I_p do ECV modificado com concentrações específicas dos NTHs-NH₂ podem ser visualizados na **Figura 15**. Os dados obtidos exibiram uma resposta máxima de corrente na concentração de 5 mg/mL de NHT-NH₂, indicando assim, que nesta concentração há uma proporcionalidade entre a quantidade dos grupos do reativos do polímero e do nanotubo na interface sensora.

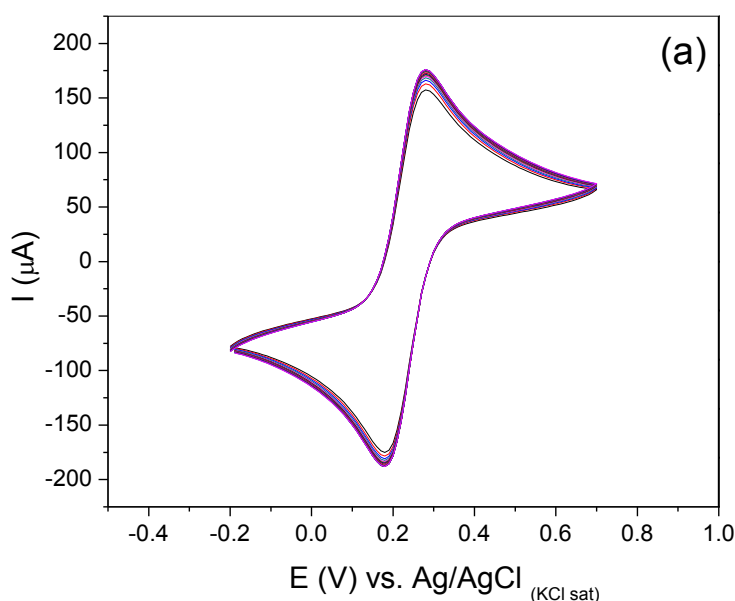
Figura 15 – Influência das diferentes concentrações de NTHs-NH₂ sobre ECV previamente eletropolimerizado com o Pi-2-COOH: (a) 1 mg/mL, (b) 2,5 mg/mL; (c) 5 mg/mL, (d) 7,5 mg/mL e (e) 10 mg/mL. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.

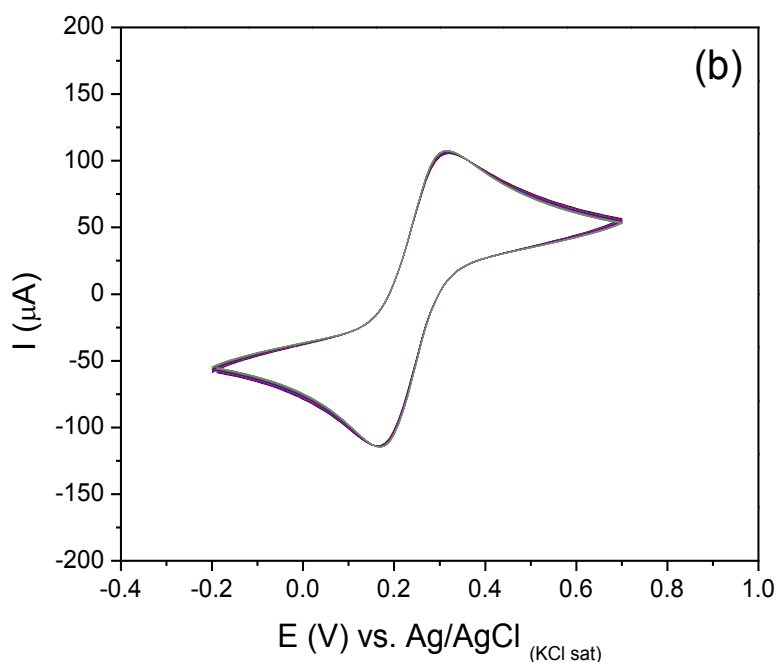


Posteriormente, a estabilidade do filme de Pi-2-COOH/NTHs-NH₂ foi investigada submetendo o ECV modificado a 20 sucessivos ciclos voltamétricos em uma solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (0,005 M). Paralelamente, um estudo controle foi realizado adsorvendo os NTHs-NH₂ diretamente sobre a superfície do ECV limpo com objetivo de comparar a estabilidade da interação do Pi-2-COOH com a haloisita. Os VCs do ECV modificado apenas com HNTs-NH₂ (5 mg/mL) na **Figura 16 (a)** apresentaram um CV de 3,2% e 2,9% para os valores de I_p e I_p , respectivamente.

Comparando com os VCs do eletrodo com Pi-2-COOH e NTH-NH₂, **Figura 16 (b)**, as sucessivas voltametrias exibiram uma maior estabilidade e um decréscimo significativo das variações de corrente. O CV calculado para as correntes de I_{p_a} e I_{p_c} do ECV/Pi-2-COOH /NTH-NH₂ foram de 0,61% e 0,44%, respectivamente. Os dados obtidos demonstram um aumento de cinco vezes da estabilidade do filme. Os grupos carboxílicos ativados com EDC/NHS do Pi-2-COOH eletropolimerizado reage com os grupamentos amina da haloisita possibilitando uma maior estabilidade do filme, em relação ao seu estudo controle. O EDC/NHS viabiliza a conversão dos grupos carboxílicos em ésteres NHS amino-reativos (PEI et al., 2010). Estes grupos são susceptíveis ao ataque nucleofílico a partir de grupamentos amina da HNT funcionalizada, resultando na formação de um ligação covalente e estável entre os materiais.

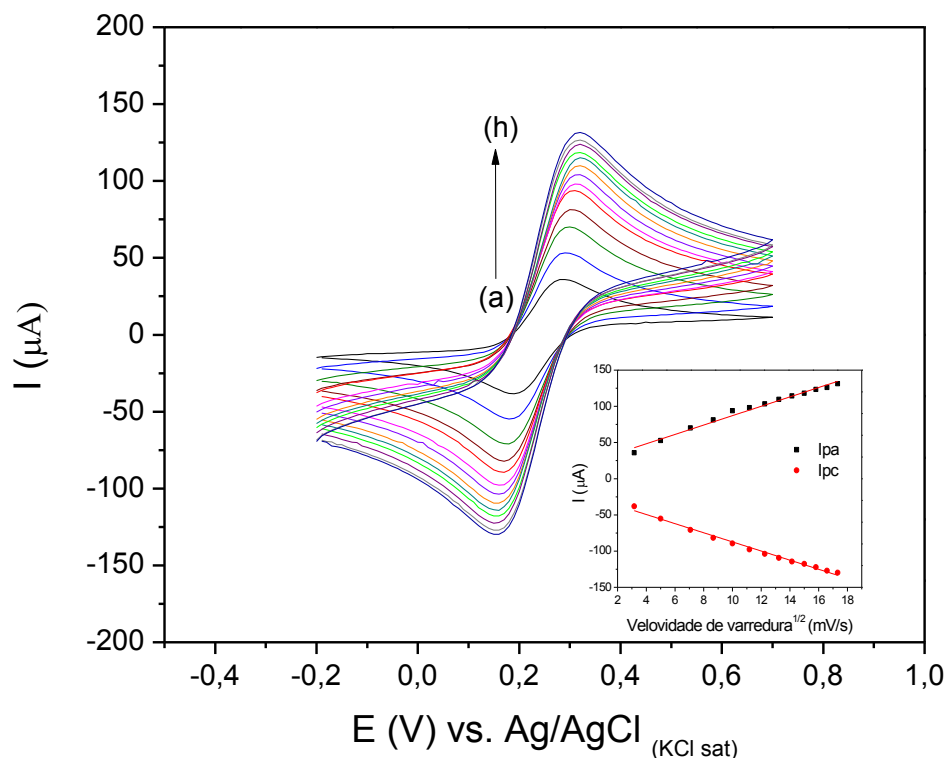
Figura 16 – Estabilidade eletroquímica do ECV modificado com **(a)** NTHs-NH₂ e **(b)** Pi-2-COOH/NTHs-NH₂ quando submetidos a 20 sucessivos ciclos voltamétricos. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.





A transferência de elétrons na interface sensora modificada com o filme de Pi-2-COOH/NTHs-NH₂ foi avaliada submetendo o ECV a leituras em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV/s). De acordo com os VCs obtidos na **Figura 17**, os potenciais dos I_{p_a} e I_{p_c} não variaram em função da velocidade de varredura selecionada para o estudo. Estes resultados demonstram que o filme apresentou uma boa reversibilidade eletroquímica. Os valores em corrente dos picos redox em relação à raiz quadrada das velocidades de varredura, apresentados no *inset* da **Figura 17**, variaram proporcionalmente, sugerindo um processo controlado por difusão (BARD & FAULKNER, 2006).

Figura 17 – VCs do ECV/Pi-2-COOH/HNT-NH₂ sob diferentes velocidades de varredura (a → h: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 mV/s). VCs realizados em K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (0,005 M) preparado em KCl (0,1 M).

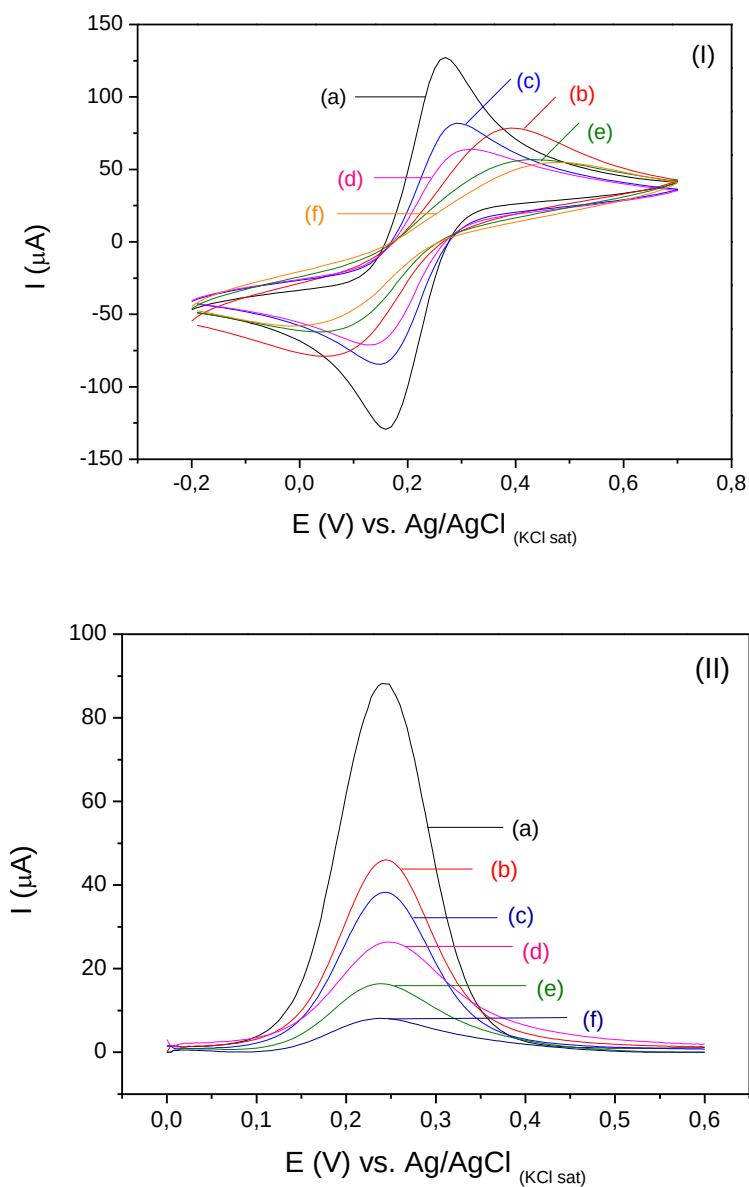


5.3 Caracterização eletroquímica do imunossensor

A caracterização eletroquímica da imobilização dos anticorpos anti-cTnT na superfície do eletrodo foi realizada utilizando as técnicas de VC e VPD, **Figura 18**, respectivamente. Comparando os voltamogramas do estudo, observa-se uma redução proporcional dos picos redox do ECV/Pi-2-COOH (**Figura 18 (b)**) e ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH₂ (**Figura 18 (c)**) em relação ao ECV limpo (**Figura 18 (a)**). Esse perfil demonstra a contribuição resistiva do filme de Pi-2-COOH e haloisita. As porções terminais aldeído do GLUT foram empregadas para imobilização covalente dos anticorpos anti-cTnT na superfície sensora (**Figura 18 (d)**). Os grupos dialdeídos reagem com as aminas livres tanto da haloisita como do anticorpo, resultando na formação de uma ligação covalente imina, ou base de Schiff (BABKINA, 1994). Uma redução nos valores de corrente também foi observada após imobilização do anti-cTnT

(5 $\mu\text{g/mL}$) e do bloqueio dos sítios livres com a glicina, devido à natureza isolante das moléculas biológicas (**Figura 18 (e)**).

Figura 18 – (I) VCs e (II) VPD das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/Pi-2-COOH; (c) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH₂; (d) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH₂/GLUT; (e) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH₂/GLUT/anti-cTnT e (f) ECV/Pi-2-COOH/NTH-NH₂/GLUT/Anti-cTnT/Glicina. Medidas realizadas em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.

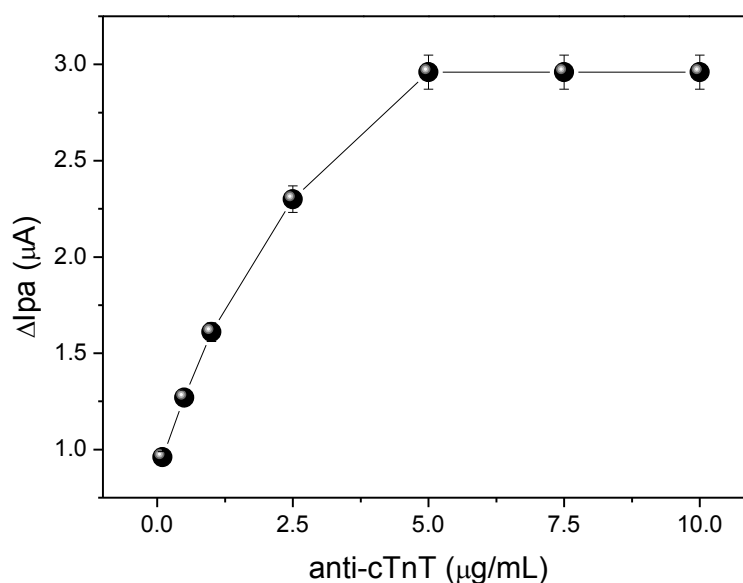


5.4 Otimização das condições experimentais

Estudos sobre a influência da concentração de anticorpo imobilizado e o tempo de interação do mesmo com seu respectivo antígeno são essenciais para o desempenho analítico do imunossensor, visto que esses fatores afetam a reação de bioafinidade através da formação de imunocomplexos na interface sensora.

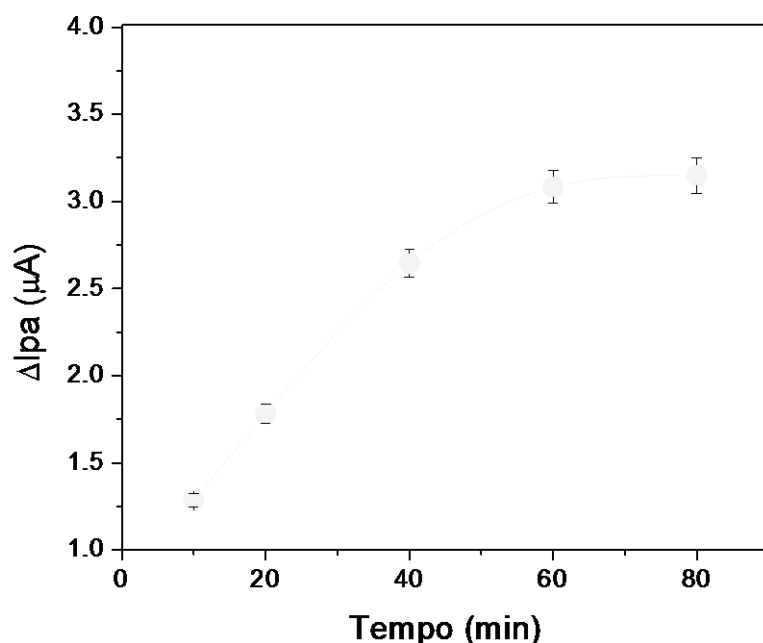
Um estudo de concentração de anticorpos anti-cTnT foi realizado para padronização do imunoensaio eletroquímico. A superfície do ECV, previamente modificada com o filme Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/GLUT, foi incubado com anticorpos anti-cTnT sob diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 µg/mL). Os valores de corrente do estudo foram analisados através da variação de I_{pa} do ECV com o anticorpo imobilizado em relação ao filme nanoestuturado (ΔI_{pa}). Como pode ser observado na **Figura 19**, os valores de ΔI_{pa} exibiram uma resposta máxima na concentração de 5 µg/mL de anticorpo, sendo observada uma saturação do sistema em concentrações superiores. Assim, a concentração de 5 µg/mL foi adotada para realização dos testes seguintes.

Figura 19 – Influência das diferentes concentrações de anti-cTnT imobilizado sobre o ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/GLUT. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.



Após a otimização da concentração do Anti-cTnT, o efeito do tempo na interação antígeno-anticorpo na interface sensora foi avaliado por meio da incubação do ECV modificado com o filme de Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/GLUT/Anti-cTnT/Glicina com a cTnT (0,5 ng/mL) durante o tempo de 10, 20, 40, 60, 80 min. Os valores de corrente foram obtidos através da diferença entre I_{pa} do ECV com e sem cTnT em função do tempo de incubação das amostras. Os resultados na **Figura 20** apresentaram uma saturação das respostas a partir do tempo de 60 minutos.

Figura 20 – Influência do tempo de imunorreação para cTnT (0,05 ng/mL) em relação ao ECV/Pi-2-COOH/NTHs-NH₂/GLUT/Anti-cTnT/Glicina. Medidas obtidas através de análises por VC em solução de 0,005 M de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ preparada em 0,1 M de KCl.



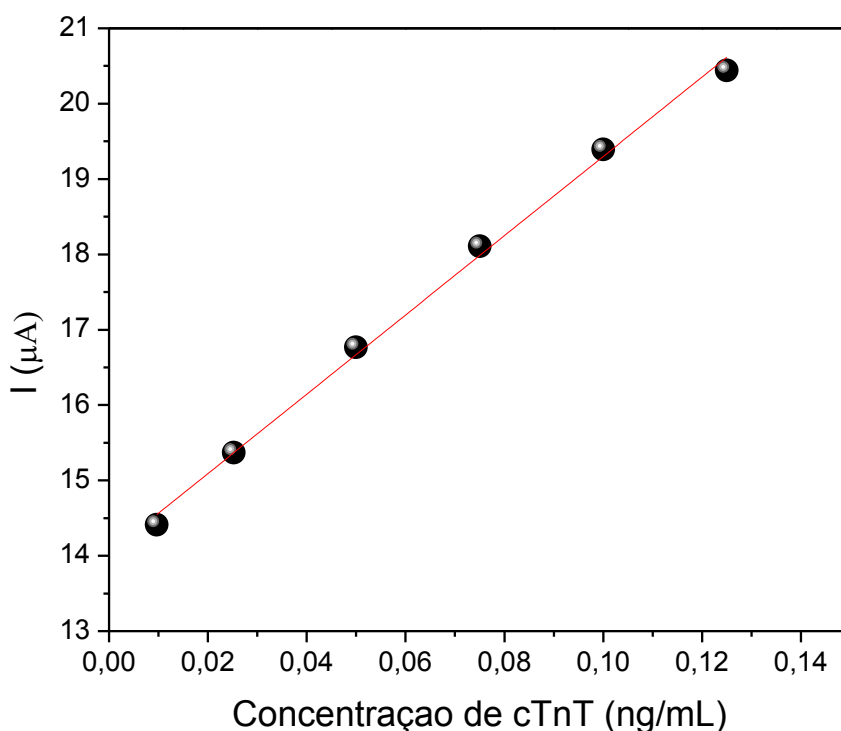
5.5 Curva de calibração para cTnT

Para construção da curva de calibração do imunossensor proposto, a técnica de voltametria de onda quadrada foi empregada. As medidas de corrente através da incubação da interface sensora com as diferentes concentrações de cTnT foram correlacionadas através da obstrução da cinética de transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo (BARD & FAULKNER, 2006), decorrentes da natureza isolante do antígeno de cTnT (SILVA et al., 2013). As concentrações avaliadas foram de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 e 0,125 ng/mL de cTnT, todas preparadas em tampão PBS (0,01

M, pH 7,4). O imunensaio eletroquímico foi realizado sob todas as condições experimentais otimizadas. Os valores de ΔI_{p_a} da curva de calibração foram obtidos através da diferença entre os voltamogramas de onda quadrada do ECV com e sem cTnT.

Um aumento proporcional das variações de ΔI_{p_a} em relação às concentrações de cTnT foi observado na **Figura 21**. O comportamento do imunossensor foi linear nas diferentes concentrações de cTnT, com coeficiente de correlação linear (r) de 0,996 ($p < 0,001$; $n = 6$). O limite de detecção (LD) do imunossensor foi calculado de acordo com a seguinte equação: $LD = 3DV/m$, onde DV é desvio padrão da medida do branco e m é o coeficiente angular da região linear da curva de calibração. O LD do imunossensor proposto foi 0,008 ng/mL e limite de quantificação (LQ) de 0,018 ng/mL. Segundo os critérios da OMS, o valor clínico discriminativo para a definição do IAM determina que valores de cTnT sejam superiores a 0,1 ng/mL (MÜLLER-BARDORFF *et al.*, 1997). Assim, o imunossensor baseado no filme híbrido de Pi-2-COOH e NHTs-NH₂ mostrou-se sensível para detecção da cTnT em níveis de importância clínica para diagnóstico do IAM.

Figura 21 – Curva de calibração do imunossensor, obtida através da variação das concentrações de cTnT. Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram utilizados Pi-2-COOH e HNTs para construção de um imunossensor eletroquímico para detecção da cTnT. A modificação do eletrodo de carbono vítreo com o filme nanoestruturado de Pi-2-COOH e haloisita funcionalizada tem contribuído para construção de um sensor estável e reprodutível eletroquimicamente. Os grupos livres reativos da haloisita foram explorados para imobilização do anticorpo anti-cTnT. O filme nanoestruturado de Pi-2-COOH/HNT mostrou-se bastante estável e reprodutível eletroquimicamente, podendo ser empregado para imobilização orientada dos anticorpos anti-cTnT utilizando seus grupos amino funcionais.

Espera-se com isso que através da detecção da cTnT utilizando diferentes técnicas eletroanalíticas possam ser desenvolvidos ensaios mais rápidos e simples. Assim, aliado a plataforma sensora que está sendo desenvolvida, o sistema representa uma alternativa viável, promissora, de custo reduzido e fácil aplicação para determinação da cTnT.

A otimização das condições experimentais forneceu uma reta de calibração para as diferentes concentrações de cTnT do imunossensor proposto, demonstrando que o sistema apresentou boa linearidade com $r=0,996$ ($p < 0,001$; $n = 6$), apresentando um limite de detecção de 0,008 ng/mL. Como perspectivas futuras deste trabalho, tem-se a realização de alguns estudos complementares, incluindo os testes com amostras de soro ou sangue total humano de pacientes saudáveis e infartados. Estes ensaios irão permitir a determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica do biossensor proposto, sua confiabilidade e praticidade quando comparado a outros sistemas comerciais usados na determinação dos níveis séricos de troponina cardíaca.

7. REFERÊNCIAS

AKCELRUD, L. “Fundamentos da ciência dos polímeros” Barueri-SP, Manole, 1-5, 2007.

ACHAR, S.A.; KUNDU, S., NORCROSS, W.A. Diagnosis of acute coronary syndrome. **American Family Physician**, v. 72, p. 119-126, 2005.

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

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

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

ARREDONDO, M., et al., Some clinical applications of the electrochemical biosensors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(12): p. 1301-1313, 2012.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 23: 1083-1100, 2008.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2ª edição. **New York: Ed. Wiley India**, 827p, 2006.

Babkina; S. S.; Vinter, V. G.; Zainullina, A. S.; *J. Anal. Chem*, v.49, p.1188, 1994.

BASSAN, R.; PIMENTA, L.; LEÃES, P. E.; TIMERMAN, A. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. Definição de graus de recomendação e níveis de evidência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 76: 1-22, 2002.

BERTON, G.; PALATINI, P. Risk stratification after acute myocardial infarction: role of neurohormones, inflammatory markers and albumin excretion rate. **Italian Heart Journal**, 4: 295-304, 2003.

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

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

CAMERON, S.J.; SOKOLL, L.J.; LATERZA, O.F.; SHAH, S.; GREEN, G.B. A multi-marker approach for the prediction of adverse events in patients with acute coronary syndromes. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, p. 168-173, 2007.

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

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

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

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Quim. Nova**, 30, 146-152, 2007.

COLLINSON, P.; GAZE, D. Cardiac troponins in intensive care. **Critical Care**, v. 9, p. 345-346, 2005.

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

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

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

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

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

DAVIES M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, p. 361-6, 2000.

DEEPAK, R. ; AGRAWAL, Y. K. Halloysite as support matrices: a review. **Emerging Materials Research**, v. 1, p. 212 –220, 2012.

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

DRESSELHAUS, M.S., DRESSELHAUS, G. & AVOURIS, P. **Carbon nanotubes: Synthesis, structure, properties and applications**. Pp. *Topics in applied physics*, 80, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. 2001.

ENDO, M., IJIMA, S. & DRESSELHAUS, M.S. **Carbon nanotubes**. Pp., Pergamon, 1996.

FENG, L., LI, H.; LI, F.; SHI, Z., GU, Z.; F Functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic molecules and their langmuir–blodgett films. **Carbon**, v. 41, p. 2385–2391, 2003.

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

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

FOSCHINI, M.; SILVA, S. H.; RAIGNA, A. S.; MARLETTA, A.; GONCALVES, D. Theoretical and experimental studies on the electronic, optical, and structural properties of poly-pyrrole-2-carboxylic acid films. **Chemical Physics**, v.425, p.91–95, 2013.

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

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

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

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N. and SCHIMIDT, C. E., Conducting polymers in biomedical engineering, *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 876-921, Aug-Sep, 2007.

GUIMARAES, L., ENYASHIN, A.N., SEIFERT, G. & DUARTE, H.A. (2010) Structural, electronic, and mechanical properties of single-walled halloysite nanotube models. **Journal of Physical Chemistry C**, v.114, p.11358-11363, 2010.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, 8:1400-1458, 2008.

GILL, N.D.; BEAVEN, C.M.; COOK, C. Effectiveness of post-match recovery strategies in rugby players. **British Journal of Sports Medicine**, 40:260-263, 2006.

GODOY, M. F. et al. Mortalidade por doenças cardiovasculares e níveis socioeconômicos na população de São Jose do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 2, p. 200-206, 2007.

GOMES-FILHO, S.L.R.; DIAS, A.C.M.S.; SILVA, M.M.S., SILVA, B.V.M.; DUTRA, R.F. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, 29: 10-15, 2013.

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

HAROOSH, J.H.; CHAUDHARY, S. D.; DONG, Y. Electrospun PLA / PCL fibras com nanoargila tubular: análise morfológica e estrutural. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 3930-3939, 2012.

HE, P.; WANG, Z.; ZHANG, L.; YANG, W. Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol. **Food Chemistry**, 112: 707–714, 2009.

HERKNER, H.; WALDENHOFER, U.; LAGGNER, A. N.; MULLNER, M.; OSCHATZ, E.; SPITZAUER, S.; GAMPER, G.; BUR, A.; HIRSCHL, M. M. Clinical application of rapid quantitative determination of cardiac troponin-T in an emergency department setting. **Resuscitation**, v. 49, p. 259-264, 2001.

HOLMVANG, L.; LUSCHER, M.S. Very early risk stratification using combined ECG and biochemical assessment in patients with unstable coronary artery disease: a thrombin inhibition in myocardial ischemia (TRIM) substudy. **Circulation**, 98: 2004-2009, 1998.

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

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, p. 354-56. 1991.

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

JANMANEE, J.; BABA, A.; PHANICHPHANT, S.; SRIWICHAI, S.; SHINBO, K.; KATO, K.; KANEKO, F. In situ Electrochemical-Transmission Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for Poly(pyrrole-3-carboxylic acid Thin-Film-Based Biosensor Applications. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.4, p.4270–4275, 2012.

JOUSSEIN, E.; PETIT, S.; CHURCHMAN, J.; THENG, B.; RIGHI, D.; DELVAUX, B. Halloysite clay minerals – a review. **Clay Miner.**, 40, 383–426, 2005.

JIANRONGA, C.; YUQINGA, M.; NONGYUE, B.H.; XIAOHUA, A.W.; SIJIAO, A.L. Nanotechnology and biosensors. **Biotechnology Advances** v.22, p.505 – 518, 2004.

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

JUBETE, E.; LOAIZA, O.A.; OCHOTECO, E.; POMPOSO, J.A.; GRANDE, H.; RODRÍGUEZ, J. Nanotechnology: a tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors. **Journal of Sensors**, 1:1-13, 2009.

KARRAS, D.J.; KANE, D.L. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. **Emergency Medicine Clinics of North America**, 19:321-337, 2001.

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

KUC, A. & HEINE, T. Shielding nanowires and nanotubes with imogolite: A route to nanocables. **Advanced Materials**, v. 21, p. 4353-56, 2009.

LAKHDAR, S. and MAYR, H. Counterion effects in iminium-activated electrophilic aromatic substitutions of pyrroles. *Chemical Communications*. v.47, p.1866-8, 2011.

LIU, P.; ZHAO, M. Silver nanoparticle supported on halloysite nanotubes catalyzed reduction of 4-nitrophenol (4-NP). **Appl. Surf. Sci.**, 255, 3989–3993, 2009.

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

LIU, G.; LIN, Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. **Talanta**, 74:308-317, 2007.

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

LÖWBER, C. Cardiac troponin T in clinical and experimental studies. **Tese**. Hospital Huddinge Unisversidade Karolinska, Instituto Karolinska, Estocolmo. 2007.

LOPES, A.C. Síndromes Coronarianas Agudas. Tratado de Clínica Médica. 1ª ed. **Rio de Janeiro: Editora Roca**, p.765, 2006.

LOUZADA, E.S.; LUCCAS, P.O.;MAGALHÃES, C.S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, 11:52-56, 2004.

LUO, X.L., MORRIN, A., KILLARD, A.J. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, 18:319-326, 2006.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, 26:492-500, 2008.

LVOV, Y.M., SHCHUKIN, D.G., MOHWALD, H. & PRICE, R.R. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. **Acs Nano**, v. 2, p. 814-820, 2008.

MANSUR P.H.G.; CURY, L.K.P.; DESTRO-FILHO, J.B.; RESENDE, E.S. DESTRO, J.P.B.; OLIVEIRA, L.M.; MORAES, D.C.G.; FREITAS, G.R.R.; ROCHA, L.S.S. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 87:106-114, 2006.

MATTOS, A.B.; FREITAS, T.A.; KUBOTA, L.T.; DUTRA, R.F. An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum. **Biochemical Engineering Journal**, 71: 97– 104, 2013.

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

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

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

MÜLLER-BARDORFF, M.; HALLERMAYER, K.; SCHRÖDER, A.; EBERT, C.; BORGIA, A.; GERHARDT, W.; REMPPIS, A.; ZEHELEIN, J.; KATUS, H. A. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation. **American Association for Clinical Chemistry**, 43:458-466, 1997.

NALWA, H. S. Handbook of organic conductive molecules and polymers. Inglaterra, ed. John Wiley & Sons Ltd, v.2, 1997.

NAKAGAKI, S. & WYPYCH, F. Nanofibrous and nanotubular supports for the immobilization of metalloporphyrins as oxidation catalysts. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 315, p. 142-157, 2007.

NICOLAU, J.C.; TIMERMAN, A.; PIEGAS, L.S.; MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A.JR. Guidelines for unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction of the brazilian society of cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, p. 89-131, 2007.

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

PAROLO, C.; MERKOCI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*, 42(2): p. 450-457, 2013.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 25:1012-1021, 2002.

PENTTILÄ, K.; KOUKKUNEN, H.; KEMPPAINEN, A.; HALINEN, M.; RANTANEN, T.; PYORALA, K.; PENTTILÄ, I. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 29, p. 93-101, 1999.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1349-1356, 2003.

PESARO, A.E.P.; SERRANO, C.V.J.; NICOLAU, J.C. Infarto agudo do miocárdio – Síndrome coronariana aguda com supradesnível do seguimento ST. **Ver. Assoc Med Bras**, v. 50, n. 2, p. 214-20, 2004.

PEI, Z.; ANDERSON, H.; MYRSKONG, A; DUNÉR, G.; INGEMARSSON, B.; AASTRUP, T. Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH

dependence of antibody orientation and antigen binding capacity, *Anal. Biochem*, v.398, p.161-168, 2010.

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

PRICE, R.R., GABER, B.P. & LVOV, Y.M. In-vitro release characteristics of tetracycline hcl, khellin and nicotinamide adenine dinucleotide from halloysite; a cylindrical mineral. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, p. 713-18, 2001.

QIU, J.D.; LIANGA, R.P.; WANGA, R.; FANA, L.X.; CHENA, Y.W.; XIAB, X.H. A label-free amperometric immunosensor based on biocompatible conductive redox chitosan-ferrocene/gold nanoparticles matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, 25: 852–857, 2009.

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

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

RIBEIRO, A. S.; RIBEIRO, L. M. O.; NAVARRO, M.; TONHOLO, J. Electrochemical polymerisation of thiophene derivative induced by Lewis acid: Electrosynthesis of poly[(R)-()-2-(3"-thienyl)ethyl-(3",5"-dinitrobenzoyl)- -phenylglycinate]. *Polymer*, V. 47, p. 8430, 2006.

RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), p. 389-407, 2005.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, 25: 316-320, 2002.

ROSATTO,S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN,N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.77-86, 2001.

SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, 24: 2749-2765, 2009.

SADKI, S.; SCHOTTLAND, P.; BRODIE, N.; et al., The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chemical Society Reviews*, vol. 29, no. 5, pp. 283-293, Sep, 2000.

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

SANTOS, P. S.; TOLEDO, S. P.; SANTOS, H. S. Caulins haloisíticos das regiões sudeste e sul do Brasil. **Cerâmica Industrial**, 14, 14–20, 2009.

SAUNDERS, B. R.; FLEMING, R. J.; MURRAY, K. S. Recent advances in the physical and spectroscopic properties of polypyrrole films, particularly those containing transition-metal complexes as counteranions. **Chemistry of Materials**, v.7, p.1082-1094, 1995.

SEZGIN, S.; ATES, M.; PARLAK, E. A.; SARAC, S. A. Scan Rate Effect of 1-(4-methoxyphenyl)-1H-Pyrrole Electro-coated on Carbon Fiber: Characterization via Cyclic Voltammetry, FTIR-ATR and Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Int. J. Electrochem. Sci.*,v. 7, p.1093 – 1106, 2012.

SUN, X.; ZHANG, Y.; SHEN, H.; JIA, N. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film. **Electrochim. Acta**, 56, 700–705, 2010.

SHI, Y., YUAN, R., CHAI, Y., & HE, X. Development of an amperometric immunosensor based on TiO₂ nanoparticles and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, 52: 3518–3524, 2007.

SILVA, B.V.M.; CAVALCANTI, I.T.; MATTOS, A.B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.D.P.; DUTRA, R.F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based

on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 26: 1062-1067, 2010.

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

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

SUPRUN, E.; BULKO, T.; LISITSA, A.; GNEDENKO, O.; IVANOV, A.; HUMYANTSEVA, V.; ARCHAKOV, A. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 25, p. 1694-1698, 2010.

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

TAMM, T.; TAMM, J.; KARELSON, M. Theoretical study of the effect of counterions on the structure of pyrrole oligomers. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.88, p.296-301, 2002.

TANG, A. The World Congress on Biosensors—Biosensors 2010. **Biosensors and Bioelectronics**, 26:1129–1130, 2010.

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

TRUONG, T. N. L.; CHIKAE, M.; UKITA, Y.; TAKAMURA, Y. Labelless impedance immunosensor based on polypyrrole-pyrolecarboxylic acid copolymer for hCG detection. **Talanta**, v.85, p. 2576– 2580, 2011.

THUSU, R. **Strong growth predicted for biosensors Market**, 2010. Disponível em: <http://www.sensorsmag.com/specialty-markets/medical/strong-growth-predicted-biosensors-market-7640>> Acesso em: 20 de maio de 2012.

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

THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; JAFFE, A.S.; SIMOONS, M. L.; CHAITMAN, B.R.; WHITE, H.D. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, V.60, 2012.

TENNE, R., MARGULIS, L., GENUT, M. & HODES, G. Polyhedral and cylindrical structures of tungsten disulfide. **Nature**, v. 360, p. 444-446, 1992.

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

VELASCO-GARCIA, M.N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 20: 27-33, 2009.

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

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

WALLACE, G. G.; SPINKS, G. M.; TEASDALE, P. R. Conductive electroactive polymers – Intelligent materials systems. Estados Unidos, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, 3ª edição, 2009.

WANG, J. H.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; ZHAO, Y. F.; ZHAI, R.; LIU, J. D.; CHEN, R. F. Rapid adsorption of Cr(VI) on modified halloysite nanotubes. **Desalination**, 259, 22–28, 2010.

WANG, C.C.; WANG, H.; WU, Z.Y.; CHEN, G.L.; YIU, R.Q. A piezoelectric immunoassay based on self-assembly monolayer of cystamine polystyrene sulfonate for determination of *Schistosoma japonicum* antibodies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373:803-809, 2002.

WHITE, R. D.; BAVYKIN D. V.; WALSH, F. C. The stability of halloysite nanotubes in acidic and alkaline aqueous suspensions. **Nanotechnology**, 23, 065705 (1–10), 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The top 10 causes of death, 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acessado em 06 de setembro de 2013.

WU, A.H.; FENG, Y.J. Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. **European Heart Journal**, 19: 25-29, 1998.

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

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

YUAN, O. C.; CHAI, R.; TANG, Y. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles-multi-walled carbon nanotubes-thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. **Analytica Chimica Acta.**, v. 603, p. 205-213, 2007.

YUAN, P.; SOUTHON, P.D.; LIU, Z.; GREEN, M.E.R.; HOOK, J.M.; ANTILL, S.J.; KEPERT, C.J. Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with γ -aminopropyltriethoxysilane. **J. Phys. Chem. C**, 112, 15742–15751, 2008.

YANG, C.; LIU, P.; ZHAO, Y. Preparation and characterization of coaxial halloysite/polypyrrole tubular nanocomposites for electrochemical energy storage. **Electrochim. Acta**, 55, 6857–6864, 2010.

ZHANG, G.J.; CHUA, J.H.; CHEE, R.E.; AGARWAL, A.; WONG, S.M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2504-2508, 2009.

ZHANG, X.; CUI, Y.; LV, Z.; LI, M.; MA, S.; CUI, Z.; KONG, Q. Carbon nanotubes, Conductive Carbon Black and Graphite Powder Based Paste Electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 6063 – 6073, 2011.