



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA



LABORATÓRIO DE BIOSSENSORES

JÉSSICA GUIMARÃES BRUSSASCO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETECÇÃO DE TROPONINA I: UM MARCADOR DO INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO**

Uberlândia
2019

JÉSSICA GUIMARÃES BRUSSASCO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO
DE TROPONINA I: UM MARCADOR DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como exigência para obtenção da Qualificação de Mestrado em Química.

Áreas de Concentrações: Ciência dos Materiais; Química do Estado Sólido; Eletroquímica Aplicada.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B912
2019
Brussasco, Jéssica Guimarães, 1993-
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO
PARA DETECÇÃO DE TROPONINA I: UM MARCADOR DO
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO [recurso eletrônico] /
Jéssica Guimarães Brussasco. - 2019.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.
Coorientador: João Marcos Madurro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2071>

Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Madurro, Ana Graci Brito , 1967-, (Orient.). II.
Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título. CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 305, PPQUI				
Data:	Três de julho de dois mil e dezenove	Hora de início:	14:15	Hora de encerramento:	16:20
Matrícula do Discente:	11722QMI001				
Nome do Discente:	Jéssica Guimarães Brussasco				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de Imunossensor eletroquímico para detecção de troponina I: um marcador do infarto agudo do miocárdio				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de biossensores para detecção de doenças				

Reuniu-se no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Carolina Gonçalves Oliveira - IQ/UFU; Márcia Maria Costa Nunes Soares - Instituto Adolfo Lutz e Ana Graci Brito Madurro orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ana Graci Brito Madurro, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Gonçalves Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/07/2019, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Graci Brito Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/07/2019, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MÁRCIA MARIA COSTA NUNES SOARES, Usuário Externo**, em 05/07/2019, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1334758** e o código CRC **F43F0A1F**.

Referência: Processo nº 23117.047393/2019-21

SEI nº 1334758

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer (1788-1860)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, minha irmã e minha avó por todo o suporte, torcida e carinho que recebo desde sempre. Agradeço especialmente a nova integrante da família, Yasmin, que ainda não sabe falar, mas já me ensinou muita coisa.

Agradeço imensamente a Ana Graci, pela oportunidade, confiança, paciência, disponibilidade e orientação (seja em campos científicos ou em campos pessoais). Agradeço ainda ao professor João Marcos pela co-orientação e oportunidade.

Agradeço ao João Afonso, meu amigo e companheiro de graduação e pós-graduação, pela amizade incondicional, por todas as vezes que esteve disposto a me ajudar e por estar presente em todos os momentos. O lugar perto do frigobar sempre será seu.

Agradeço ao Pedro Guedes, a pessoa mais incrível que eu conheci nos últimos tempos. Muito obrigada por me fazer de pupila, pelo auxílio em todas as partes dessa dissertação, pelos duetos de HSM, pelos ensinamentos de vida e por sempre ficar do meu lado. É fantástico ser sua amiga! Estarei sempre aqui, batendo três palmas para você!

Agradeço ao Vitor, por tornar a minha vida mais leve, divertida e feliz! Que bom que eu te encontrei!

Agradeço aos meus colegas de laboratório, por todo o auxílio que disponibilizaram na realização desse trabalho, seja na discussão e interpretação de dados, ou apenas na convivência agradável, que tornava a rotina mais divertida.

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade, participação e contribuição neste trabalho.

Agradeço ao laboratório IPAC- SABIN pelo fornecimento das amostras de pacientes.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

RESUMO

Biomarcadores cardíacos são espécies moleculares usadas na prática clínica para o diagnóstico ou prognóstico de doenças, que são liberados na corrente sanguínea com a ocorrência de algum episódio cardíaco, como por exemplo, o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Dentre os biomarcadores cardíacos destaca-se a Troponina I, considerada padrão-ouro para diagnóstico precoce de IAM. Sabendo-se que a sensibilidade dos testes convencionais para o diagnóstico precoce do IAM é baixa e apresenta limitações (como rapidez e necessidade de mão de obra qualificada), torna-se relevante o desenvolvimento de metodologias analíticas mais sensíveis, como os imunossensores eletroquímicos, que são plataformas versáteis, baseadas na ligação altamente específica e seletiva entre antígenos e anticorpos. Neste trabalho, produziu-se um imunossensor eletroquímico para a detecção de troponina I, utilizando-se eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito de óxido de grafeno reduzido e politiramina, que foi capaz de detectar o biomarcador troponina I em concentrações diminutas em soro, cujo limite de detecção alcançado foi da ordem de 0,2 ng/mL, apresentou estabilidade de resposta de corrente em até 30 dias após sua fabricação, capacidade de reuso por duas análises subsequentes, indicou especificidade de resposta para o antígeno troponina I, além de diferenciar amostras reais de pacientes saudáveis e doentes, Análises adicionais por microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram modificações na superfície do imunossensor, havendo diminuição da rugosidade ao longo das etapas de construção, atribuído a formação do imunocomplexo.

Palavra-chave: bioeletrodo; imunossensor; infarto agudo do miocárdio; nanocompósito, troponina I.

ABSTRACT

Cardiac biomarkers are molecular species used in clinical practice for the diagnosis or prognosis of diseases, which are released into the bloodstream with the occurrence of a cardiac episode, such as acute myocardial infarction (AMI). Cardiac biomarkers include Troponin I, which is considered the gold standard for early diagnosis of AMI. Since the sensitivity of conventional tests for the early diagnosis of AMI is low and has limitations (such as speed and the need for a skilled workforce), the development of more sensitive analytical methodologies, such as electrochemical immunosensors, is relevant. are versatile platforms, based on highly selective and selective binding between antigens and antibodies. In this work, an electrochemical immunoassay for the detection of troponin I was produced, using graphite electrodes modified with reduced graphene oxide nanocomposite and polythramine, which was able to detect the troponin I biomarker in minute concentrations in serum, whose limit of detection was of the order of 0.2 ng / mL, showed stability of current response within 30 days after its manufacture, ability to reuse by two subsequent analyzes, indicated specificity of response for the troponin I antigen, besides differentiating (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) indicated changes in the surface of the immunosensor, and there was a decrease in the roughness throughout the construction stages, attributed to the formation of the immunocomplex

Keywords: bioelectrode; immunosensor, acute myocardial infarction, nanocomposite; troponin I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de isquemia cardíaca devido a deposição de placas ateroscleróticas.	16
Figura 2 – Tipos de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).....	17
Figura 3 –Estrutura da Troponina I (TnIc).	19
Figura 4 - Princípio de funcionamento dos biossensores.	20
Figura 5 - Classificação dos biossensores baseando-se na espécie de bioreceptor empregado e tipo de transdutor utilizado.	20
Figura 6: Estrutura de um anticorpo.....	21
Figura 7: Processos faradaicos com transporte de massa e transferência de elétrons.	22
Figura 8: Tipos de transporte de massa, sendo A indicativo da difusão, B indicativo da migração e C indicativo da convecção.	23
Figura 9: Estrutura molecular das espécies tiramina e politiramina	25
Figura 10: Mecanismo de eletropolimerização da tiramina em meio ácido.	26
Figura 11: Organização tridimensional dos átomos de grafeno	27
Figura 12: Representação esquemática da célula de três compartimentos sendo (A) eletrodo auxiliar de platina, (B) eletrodo de trabalho de grafite,(C) eletrodo de referência de Ag/AgCl.	30
Figura 13: Metodologia de preparo dos eletrodos de trabalho, envolvendo corte, colagem e polimento dos mesmos	31
Figura 14: Esquema de síntese do Óxido de Grafeno (OG)	32
Figura 15: Visualização dos eletrodos de trabalho a olho nu antes (A) e após (B) a etapa de polimento.....	36
Figura 16: Superfície do grafite antes do polimento (A) e após o polimento (B) vistas em microscópio (ampliação de 4 vezes).	36
Figura 17: Voltamograma Cíclico do eletrodo de grafite (EG) em eletrólito suporte HClO ₄ 0,5 mol/L com velocidade de 50 mV/s	37
Figura 18: Redução eletroquímica por voltametria cíclica do OG na superfície do eletrodo de grafite em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, entre 0,0 a -1,5 V, 10 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV/s.	38
Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ (5 mmol/L) e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre - 0,4 V e 1,0 V. Em (—) EG, (—) EG/OG e (—) EG/OGr.....	39

Figura 20: Polimerização eletroquímica da tiramina (2,5 mmol/L) em HClO ₄ (0,5 mol/L) com varredura de 20 ciclos a 50 mV/s entre 0,0V a +1,1V.	40
Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ (5 mmol/L) e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre -0,4V e 1,0V. Em (—) EG, (—) EG/PTir e (—) EG/OGr/PTir	41
Figura 22: Voltametria cíclica em eletrólito suporte HClO ₄ 0,5 mol/L na velocidade de 50 mV/s entre 0,0V a +1,1V. Em (—) EG, (—) EG/PTir, (—) EG/OGr/PTir.	42
Figura 23: Representação da adsorção física do anticorpo anti-TnIc sobre EG/GOr/PTir.	43
Figura 24: Voltamogramas de pulso diferencial em solução aquosa de solução aquosa de 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s ⁻¹ contendo K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol/L para EG/PTir/anti-TnIc na ausência (—) e presença de soro de paciente saudável enriquecido com 0,4 ng/mL de TnIc (—). (A) TnIc 10 µg/mL e (B) TnIc 1 µg/mL	43
Figura 25: Histogramas da resposta de corrente de pico usando anti-TnIc 1 µg/mL (A) e 10 µg/mL (B).	44
Figura 26: Voltametrias de pulso diferencial em solução aquosa de 0,1 mol/L de KCl contendo K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol/L, 50mV/s, faixa de potencial: -0,2V e 0,6 V, para EG/GOr/PTir/TnIc na ausência (—) e presença de soro humano enriquecido com diferentes concentrações de TnIc: 0,002 ng/mL (—), 0,006 ng/mL (—), 0,08 ng (—), 1 ng/mL (—), 2 ng/mL (—) e 4 ng/mL (—).....	45
Figura 27: Resposta linear e parâmetros da análise de regressão da curva analítica	46
Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial em solução de sonda aniônica (K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol/L e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre -0,1V e 0,5V. Em (—) anticorpo anti troponina I (sonda) e (—) antígeno troponina I na concentração 5 ng/mL	47
Figura 29: Estabilidade do imunossensor durante 40 dias.	48
Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial para EG/OGr/anti-TnIc em solução de sonda aniônica (K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol/L e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre -0,1 e 0,6 V. Em (—) Troponina T, (—) hormônio T ₃ , (—) Proteína C-reativa e (—) Troponina I em soro de paciente saudável enriquecido com 4 ng/mL, diluído em tampão fosfato de sódio pH=7,4.	49
Figura 31: Histograma relacionando os valores de corrente de pico obtidos na análise de amostras de soro de pacientes saudáveis (N1-N4) e pacientes acometidos por IAM (P1-P9). ..	50
Figura 32: Histograma relacionando os valores de corrente de pico em função do número de regenerações do imunossensor.	51

Figura 33: Imagens da topografia da superfície por AFM para EG/OGr/PTir/anti-TnIc (A), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA (B), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro não enriquecido com TnIc (C), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro enriquecido com TnIc (D)..... 52

Figura 34: Imagens de MEV para EG/OGr/PTir/anti-TnIc (A), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA (B), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro não enriquecido com TnIc (C), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro enriquecido com TnIc (D). Ampliação 500.000 vezes.53

LISTA DE ABREVIATURAS

A: área do eletrodo

AFM: Microscopia de Força Atômica

Anti-TnIc: Anticorpo anti troponina I

BSA: Soro de albumina bovina

Creatinina fosfoquinase: CK

Creatina fosfoquinase fração MB: CK-MB

DCV: Doenças Cardiovasculares

EG: Eletrodo de Grafite

EG/OGr/ PTir: Eletrodo de grafite/Óxido de grafeno reduzido/ Politiramina

F: Constante de Faraday

I: Corrente faradaica

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

Ipa: Intensidade de pico anódico

Ipc: Intensidade de pico catódico

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

J: Fluxo de moléculas do analito

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

MEV: Microscopia de Varredura Eletrônica

mL: mililitro

µg: micrograma

µL: microlitro

n: número de elétrons envolvidos na reação

ng: nanograma

nm: nanômetros

OG: Óxido de Grafeno

OGr: Óxido de Grafeno reduzido

OGr/ PTir: Óxido de grafeno reduzido/Politiramina

OMS: Organização Mundial de Saúde

pH: Potencial Hidrogeniônico

Ptir: Politiramina

Sa: média aritmética da rugosidade

Sq/RMS: média da raiz quadrada da rugosidade

Sz/Smáx: altura máxima da rugosidade

Tn: Troponinas

TnCc: Troponina C

TnIc: Troponina I

TnTc: Troponina T

VC: voltametria cíclica

VDP: voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)	15
1.1.2 Troponinas (Tn).....	16
1.1.2.1 Troponina I (TnIc).	17
1.2 Biossensores.....	18
1.2.1 Definição e tipos de biossensores.	18
1.2.2 Imunossensores.....	20
1.2.2.1 Imunossensores Eletroquímicos.	21
1.3 Utilização de polímeros condutores em biossensores	23
1.3.1 Tiramina	24
1.4 Aplicação de nanomateriais em biossensores.	25
1.4.1 Grafeno.....	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1 Equipamentos, reagentes e soluções.	28
3.2 Tratamento de dados.....	29
3.3 Reagentes e amostras biológicas.	29
3.4 Etapas para a construção do imunossensor	30
3.4.1 Preparo do eletrodo de grafite (EG).....	30
3.4.2 Caracterização eletroquímica primária por Voltametria Cíclica (VC) do eletrodo de grafite.....	31
3.4.3 Redução eletroquímica de Óxido de Grafeno (OG) sobre a superfície do eletrodo de grafite (EG)	31
3.4.4 Eletropolimerização do monômero tiramina sobre o eletrodo de grafite (EG) funcionalizado com Óxido de Grafeno reduzido (OGr).	31
3.4.5 Caracterização eletroquímica secundária por Voltametria Cíclica (VC) do eletrodo de grafite funcionalizado com Óxido de Grafeno reduzido e eletropolimerizado com tiramina (EG/OGr/PTir).....	32
3.4.6 Imobilização do anticorpo anti troponina I.....	32

3.4.7 Aplicação da solução de bloqueio albumina de soro bovino (BSA)	32
3.4.8 Incubação com o antígeno troponina I	32
3.4.9 Análises morfológicas	33
3.4.10 Ensaio de especificidade	33
3.4.11 Curva de calibração.	33
3.4.12 Estabilidade	33
3.4.13 Diferenciação entre pacientes saudáveis e doentes	34
3.4.14 Protocolo de regeneração dos eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito (EG/OGr/ PTir) após as análises de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Polimento dos eletrodos de grafite	35
4.2 Ensaio eletroquímicos referentes a funcionalização dos eletrodos de grafite (EG) com o nanocompósito de Óxido de Grafeno (OGr) e politiramina (EG/OGr/PTir).....	36
4.2.1 Escolha dos eletrodos de trabalho (ET).	36
4.2.2 Redução eletroquímica do óxido de grafeno (OG)	37
4.2.3 Eletropolimerização do monômero da tiramina	38
4.3 Construção do imunossensor	41
4.3.1 Imobilização e otimização da concentração do anticorpo anti troponina I (anti-TnIc).	41
4.3.2 Construção da curva de calibração.	44
4.3.3 Estabilidade do imunossensor	46
4.3.4 Ensaio de seletividade	47
4.3.5 Diferenciação entre pacientes saudáveis e doentes.	49
4.3.6 Regeneração do imunossensor	49
4.3.7 Análises da topografia da superfície do imunossensor	50
5 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

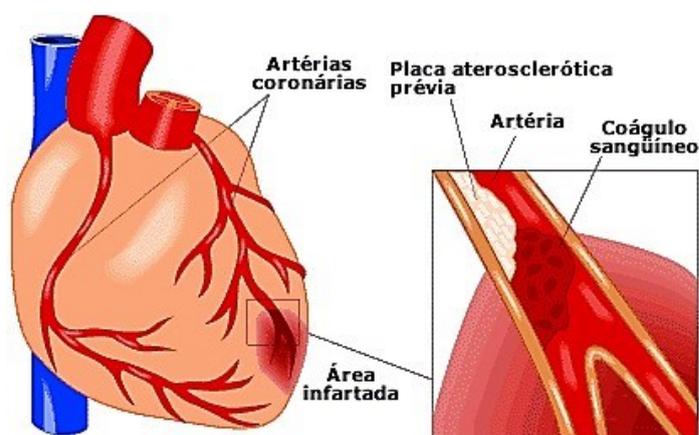
1 INTRODUÇÃO

1.1 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

As doenças cardiovasculares (DCV) acometem grande parte da população mundial, sendo consideradas um grave problema de saúde pública. Estimativas divulgadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que em 2020 as DCV serão as principais responsáveis pelas taxas de mortalidade^[1]. Alguns fatores de risco, como obesidade, sedentarismo, hipertensão, rotina estafante, idade entre 40 e 50 anos, hipercolesterolemia e histórico familiar podem ser encontrados nos indivíduos acometidos por tal doença^[2].

Dentre as doenças cardiovasculares mais relevantes destacam-se: hipertensão arterial sistêmica, síndrome coronariana aguda, insuficiência cardíaca, arritmias, doenças valvulares e o infarto agudo do miocárdio (IAM), que acontece devido a isquemia (interrupção parcial ou total do aporte sanguíneo) no músculo cardíaco, resultando na diminuição da capacidade contrátil, débito cardíaco, pressão arterial e volume sistólico^[3]. A isquemia pode acontecer por diversas razões, sendo as mais comuns: rompimento de vasos, formação de trombos e deposição de placas ateroscleróticas nos vasos coronarianos, conforme indica a Figura 1^[4].

Figura 1: Representação de isquemia cardíaca devido à deposição de placas ateroscleróticas.

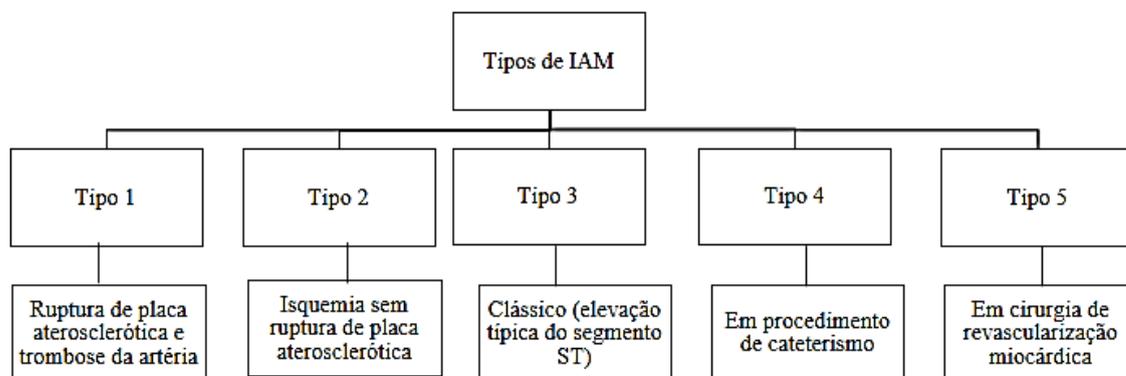


Fonte:^[4]

Pacientes com suspeita de IAM apresentam sintomatologia clássica: dor precordial (de caráter irradiante ou esmagador que atinge dorso, membros superiores, mandíbula e pescoço), náuseas, vômitos, dispneia, fraqueza muscular, sudorese, palpitações e elevação da pressão arterial^[5]. De acordo com as diretrizes divulgadas pela quarta definição universal de infarto agudo do miocárdio^[6], existem cinco tipos de IAM, onde cada tipo é caracterizado pela

ocorrência dos eventos dispostos na Figura 2.

Figura 2: Tipos de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).



Fonte: A autora.

Do ponto de vista bioquímico, a ocorrência de um episódio de IAM interrompe a glicólise aeróbica levando a um quadro de glicólise anaeróbica, que acarretará em acúmulo de ácido láctico (e obviamente, redução do pH) resultando em morte celular por necrose com liberação macromoléculas na circulação, denominadas biomarcadores cardíacos de IAM, tais como: Creatinina fosfoquinase (CK), Creatina fosfoquinase fração MB (CK-MB) e Troponinas (Tn)^[5].

1.1.2 Troponinas (Tn)

As troponinas (Tn) são proteínas de lesão miocárdica encontradas em um complexo com actina, tropomiosina e miosina, espécies responsáveis pelo movimento contrátil cardíaco. As troponinas dividem-se em três unidades: C (TnCc), I (TnIc) e T (TnTc), que por sua vez, são expressas tanto no músculo cardíaco quanto no músculo esquelético. Ressalta-se que a TnCc exibe a mesma isoforma em ambos locais, sendo assim não apresenta relevância clínica para diagnóstico de IAM, enquanto a TnIc e TnTc apresentam formas diferentes nos ambientes citados, sendo utilizadas como biomarcadores de grande importância para detecção de IAM^[7].

Comparada com os demais biomarcadores cardíacos, as Tn destacam-se devido aos seguintes fatores: especificidade de resposta a lesão cardíaca^[8,9] (em situações fisiológicas, a fração da Tn no citoplasma é mínima, de 5 a 8%); tempo em que permanecem alteradas é superior aos outros biomarcadores^[10,11], visto que a CK-MB retorna aos níveis basais em 2 dias enquanto a alteração da Tn perdura por até 9 dias; em casos de angina instável, a CK-MB apresenta concentração normal ao passo de que a Tn apresenta uma alteração mínima de

extrema importância (levando assim a definição de um quadro de microinfarto)^[11,12].

As troponinas apresentam enorme importância clínica, visto que a interpretação dos seus valores é o cerne da diferenciação entre quadros de injúria cardíaca e IAM, situação preconizada pela Quarta Definição Universal de Infarto Agudo do Miocárdio publicada em 2018. Nesse documento, estabelece-se a elevação da Tn acima do percentil 99 (valor discriminativo para diagnóstico) concomitantemente com algum sintoma típico (isquemia, presença de trombose coronária e alteração de exames de imagem e ecocardiogramas, por exemplo) configura um quadro de IAM; enquanto eventos de injúria cardíaca são identificados apenas por aumento de troponina não ocorrendo os sintomas acima descritos^[6].

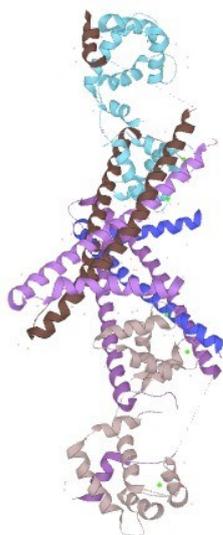
Apesar da elevada especificidade que as troponinas apresentam frente a situações de IAM, ressaltam-se duas situações: nenhum diagnóstico definitivo é feito baseado apenas na análise um biomarcador isolado, sendo assim o paciente que adentra um hospital relatando sintomas de IAM geralmente realizará a dosagem de um marcador precoce (mioglobina e CK-MB) e de um marcador tardio definitivo (incluindo a CK-MB e as troponinas) mais de uma vez durante a sua estadia clínica; as troponina podem alterar-se em outras situações clínicas como sepse, miosite, insuficiência renal, embolia pulmonar, dentre outras, cabendo assim ao profissional competente interpretar as diferentes situações^[13].

Apesar de ambas serem utilizadas nos diagnósticos de IAM, observa-se maior especificidade como da TnIc em comparação com a TnTc, visto que a forma cardíaca da TnIc difere em 31 aminoácidos a mais da sua forma esquelética, enquanto a forma cardíaca da TnTc apresenta apenas 11 aminoácidos extras em relação a forma esquelética^[12].

1.1.2.1 Troponina I (TnIc)

A Troponina I (TnIc) (Figura 3) é uma proteína de peso molecular correspondente a 23,500 Da, raramente encontrada na forma livre, estando majoritariamente complexada com a TnCc ou complexada com a TnTc e com a TnCc, sendo assim, a sua definição como um analito isolado (espécie que deseja-se analisar) é complexa^[13].

Figura 3: Estrutura da Troponina I (TnIc)



Fonte: [14]

Existem diferentes testes imunológicos no mercado para detecção de TnIc, porém seus limites de detecção são baixos (apresentam valores positivos em concentrações acima de 0,5 ng/mL) e não existe uma padronização relacionada aos valores de referência adotados. Além de testes imunológicos pode-se realizar ensaios de quimioluminescência para quantificação de TnIc, porém esta metodologia utiliza reagentes de preço elevado, o que acaba influenciando o custo final dessa análise repassado para o paciente.

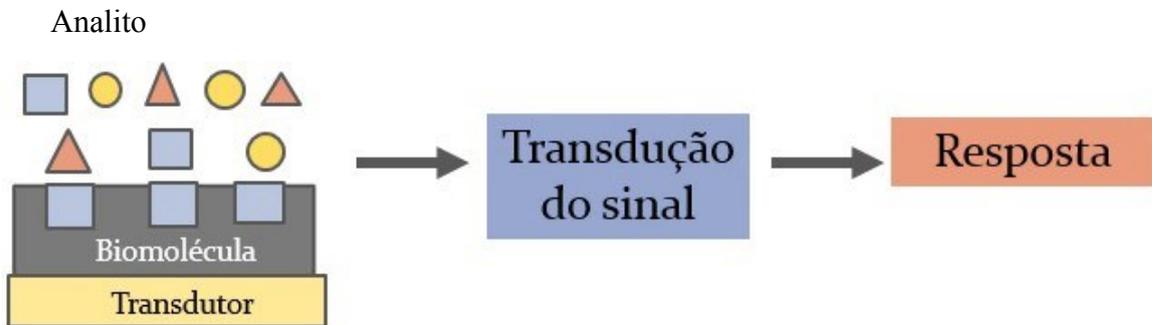
Nesse aspecto, destaca-se a utilização dos imunossensores (uma das classes dos biossensores) como uma opção de ferramenta analítica capaz de realizar a detecção de TnIc, um marcador padrão-ouro, em amostras biológicas de pacientes acometidos por IAM.

1.2 Biossensores

1.2.1 Definição e tipos de biossensores

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure Applied Chemistry – IUPAC*) define os biossensores como dispositivos que utilizam reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras isoladas para detectar compostos químicos geralmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos^[15]. Os biossensores são constituídos por três componentes: analito (substância que deseja-se detectar), bioreceptor (biomolécula que reconhece de maneira específica o analito e está imobilizada sob um substrato) e transdutor (converte a ligação entre analito e bioreceptor em sinal mensurável), havendo a exibição de dados em uma interface “amigável”, que indica a resposta na forma de números ou imagens^[16]. O princípio de funcionamento dos biossensores é ilustrado na Figura 4.

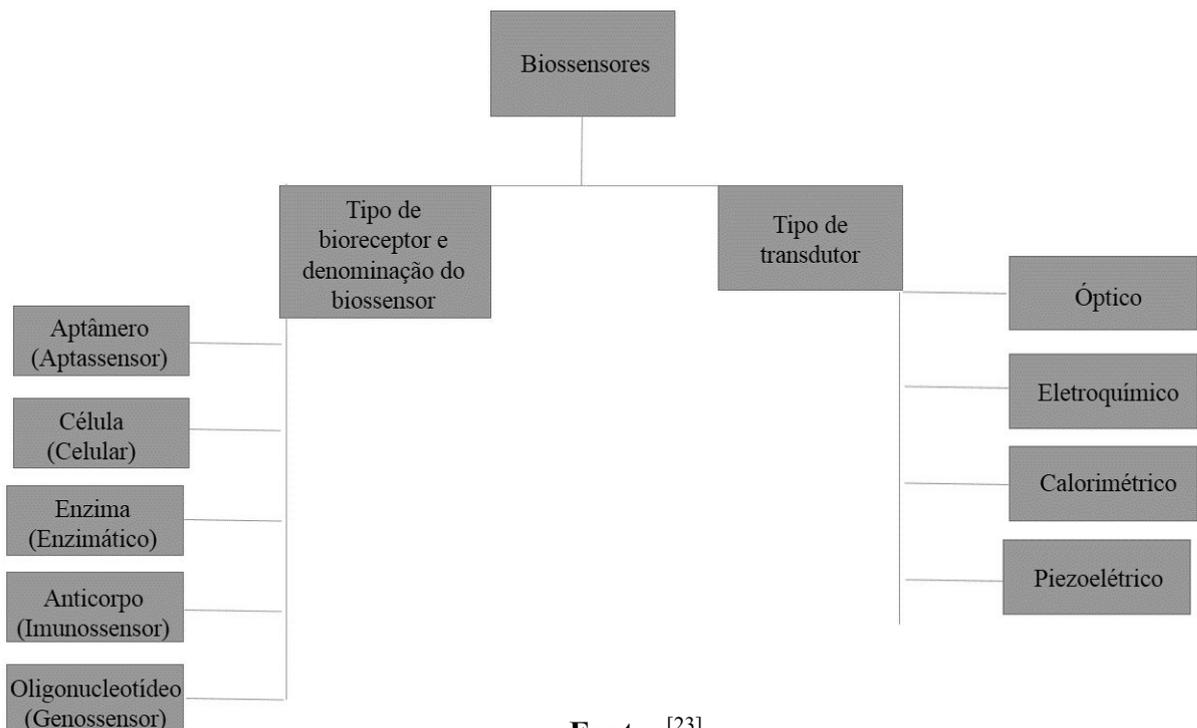
Figura 4: Princípio de funcionamento dos biossensores.



Fonte: A autora.

Os biossensores podem ser aplicados em áreas distintas, como médica^[17,18] alimentícia^[19, 20] e forense^[21,22]. Sua utilização como ferramenta analítica, em detrimento das metodologias tradicionais, justifica-se devido a possibilidade de miniaturização e portabilidade dos dispositivos, bem como em relação a obtenção de análises rápidas e de baixo custo, mesmo empregando matrizes complexas. Em linhas gerais, classificam-se os biossensores baseando-se em dois parâmetros: bioreceptor empregado e transdutor utilizado, conforme indicado na Figura 5.

Figura 5: Classificação dos biossensores baseando-se na espécie de bioreceptor empregado e tipo de transdutor utilizado.



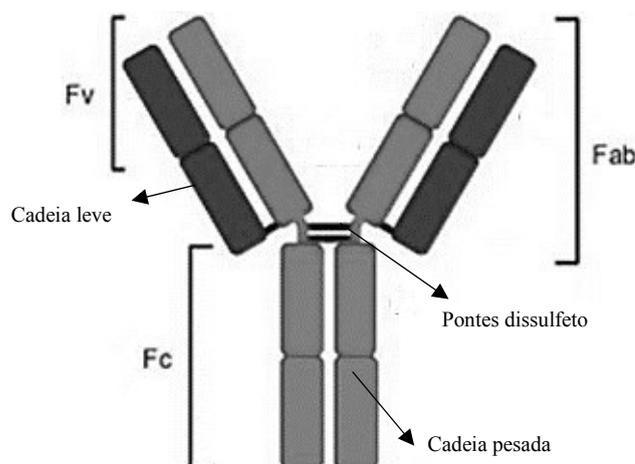
Fonte: [23]

1.2.2 Imunossensores

Conforme indicado na Figura 5, os biossensores que possuem anticorpos (ou antígenos) como moléculas de bioreconhecimento são denominados imunossensores, cuja característica fundamental de especificidade ocorre na formação do imunocomplexo (interação antígeno x anticorpo). A formação dos imunocomplexos envolve a presença de forças não covalentes, como ligação de hidrogênio, forças de van der Waals e atração eletrostática, sendo sua formação do imunocomplexo é reversível, podendo ocorrer dissociação em valores de pH extremos (grande acidez ou elevada alcalinidade), utilização de detergentes ou soluções supersaturadas^[24]. Também denominados imunoglobulinas, os anticorpos são componentes do sistema imune, produzidos pelos linfócitos B em resposta a presença de moléculas estranhas ao organismo, os antígenos. Existem cinco classes de anticorpos (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE), a produção de cada uma está condicionada ao tipo de antígeno que invadiu o organismo^[25].

Os anticorpos são compostos por cadeias de polipeptídeos (divididas em cadeias leves e cadeias pesadas) que se organizam em forma de “Y”, ligadas entre si por pontes de dissulfeto. De uma maneira geral, os anticorpos apresentam três regiões básicas: porção Fc (região constante), porção Fab (região variável responsável pelo reconhecimento do antígeno) e porção Fv (extremidade da porção Fab que se liga ao epítipo do antígeno^[26]) tal como representado na Figura 6.

Figura 6: Estrutura de um anticorpo.



Fonte: ^[26]

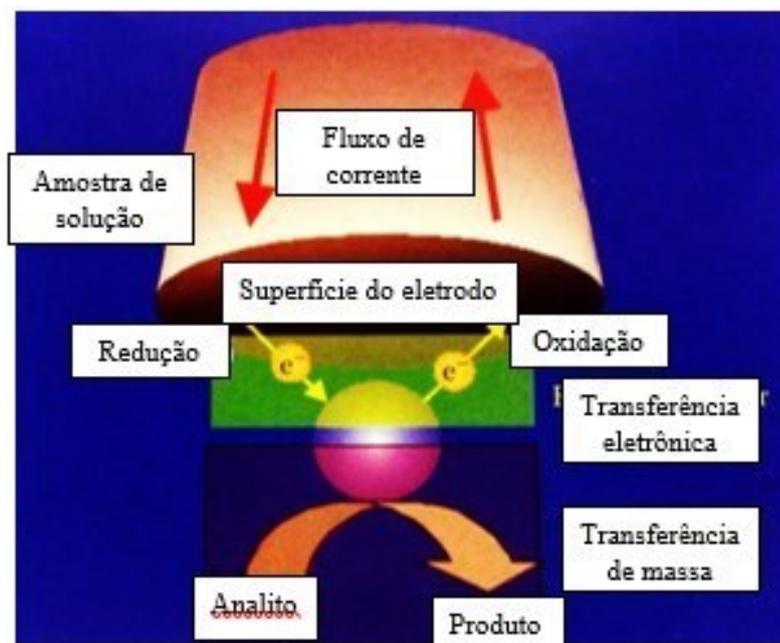
1.2.2.1 Imunossensores Eletroquímicos

Os imunossensores eletroquímicos são aqueles cujo sistema de transdução é baseado na execução de técnicas eletroquímicas, tais como voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD). O princípio básico de funcionamento dos imunossensores eletroquímicos é baseado na alteração de corrente observada antes e depois da formação do imunocomplexo, que é proporcional a concentração do analito de interesse^[27]. A corrente formada nesse tipo de processo é denominada faradaica, sendo expressa na Equação 1:

Equação 1: $I = n F A j$

A Equação 1 traduz a proporcionalidade entre corrente observada (I), número de elétrons envolvidos na reação (n), área do eletrodo (A), constante de Faraday (F) e fluxo de moléculas de analito (j). Os processos faradaicos são regulados por mecanismos de transporte de massa e transferência de elétrons, conforme indicado na Figura 7^[28].

Figura 7: Processos faradaicos com transporte de massa e transferência de elétrons.

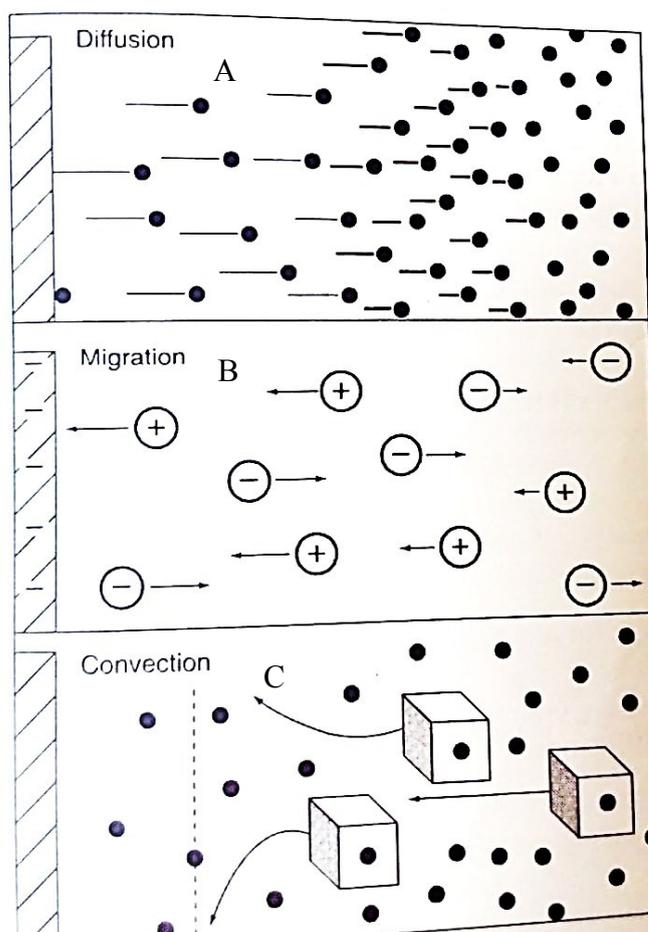


Fonte:^[28]

Com a análise da Figura 7 observa-se que a transferência de elétrons ocorre na superfície do eletrodo com os processos redox, sendo o transporte de massa responsável por regular a movimentação dos elétrons na extensão do meio reacional^[28].

O transporte de massa (Figura 8) é um mecanismo que pode ocorrer em três modos diferentes: difusão (movimento espontâneo de acordo com a influência de um gradiente de concentração), convecção (movimento regiões de concentração) e migração (movimento de partículas carregadas ao longo do campo elétrico aplicado^[29]).

Figura 8: Tipos de transporte de massa, sendo A indicativo da difusão, B indicativo da migração e C indicativo da convecção.



Fonte: Adaptado ^[29]

Em análises voltamétricas, deseja-se a minimização do transporte de massa por convecção e migração e a ampliação do transporte de massa por difusão (visto que os dois primeiros correspondem a processos não faradaicos), logo utiliza-se excesso de eletrólito suporte para minimizar a formação de um campo elétrico que favoreceria a migração devido a um gradiente de cargas e mantém-se todo o aparato eletroquímico em repouso a fim de evitar a movimentação por convecção^[29].

Conforme citado anteriormente, a voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica de grande utilização para a construção de imunossensores eletroquímicos, pois fornece informações importantes acerca da cinética de transferência eletrônica e termodinâmica dos processos redox. Nessa técnica realiza-se uma varredura de potencial nos sentidos direto (regiões anódicas, positivas) e indireto (regiões catódicas, negativas), havendo a medida da corrente gerada em função do potencial aplicado (I vs. E) no eletrodo de trabalho^[30,31].

Na técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) aplicam-se pulsos de amplitude fixos sobre o eletrodo de trabalho, realizando-se medições de corrente antes e depois da aplicação desses pulsos, sendo que o grande diferencial dessa técnica reside na diminuição da corrente capacitiva (oriunda do carregamento da dupla camada elétrica) e ampliação da corrente faradaica (corrente derivada dos processos redox na interface eletrodo-solução), justificando-se assim seu elevado emprego para a análise dos biossensores eletroquímicos^[32].

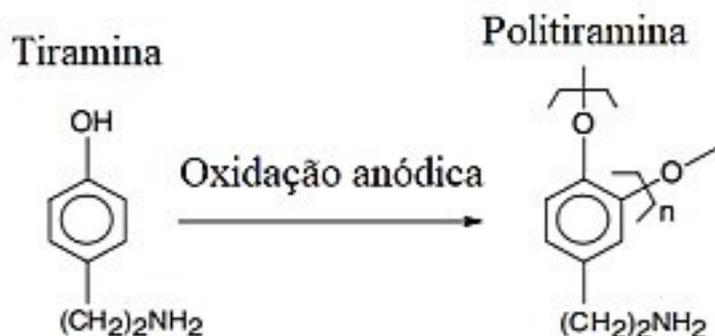
1.3 Utilização de polímeros condutores em biossensores

Observa-se uma expressiva melhoria no desempenho dos biossensores quando se realiza uma modificação na superfície dos seus eletrodos de trabalho, conseguindo-se uma imobilização da biomolécula mais eficiente e resultando em um dispositivo mais sensível e seletivo^[33]. A aplicação de polímeros condutores via polimerização eletroquímica é uma metodologia largamente explorada e útil para a finalidade aqui discutida, pois tal classe apresenta uma rede de elétrons π que facilitam a condução de corrente e quando eletrodepositados apresentam características interessantes, como simplicidade de metodologia, reprodutibilidade, estabilidade, controle da espessura do filme e biocompatibilidade^[34,35].

As reações de polimerização acontecem em três etapas: iniciação (promoção de espécies particularmente reativas a partir do monômero). A propagação (etapa rápida onde ocorre o crescimento da cadeia) e terminação (fase final de crescimento da cadeia, onde ocorrem reações de poliadição^[36]).

O monômero tiramina (4-hidróxi-fenetilamina) (Figura 9) é uma espécie muito utilizada para a obtenção de filmes poliméricos devido a sua reprodutibilidade e estabilidade dos filmes obtidos. Estas características estão ligadas à sua estrutura molecular, que apresenta um grupamento hidroxila (-OH), tornando-a solúvel em compostos polares, um grupamento amina protonado que facilita o ancoramento de bioreceptores por adsorção física (via interação eletrostática) e anéis aromáticos configurando uma deslocalização da nuvem π de elétrons^[37].

Figura 9: Estrutura molecular das espécies tiramina e politiramina.

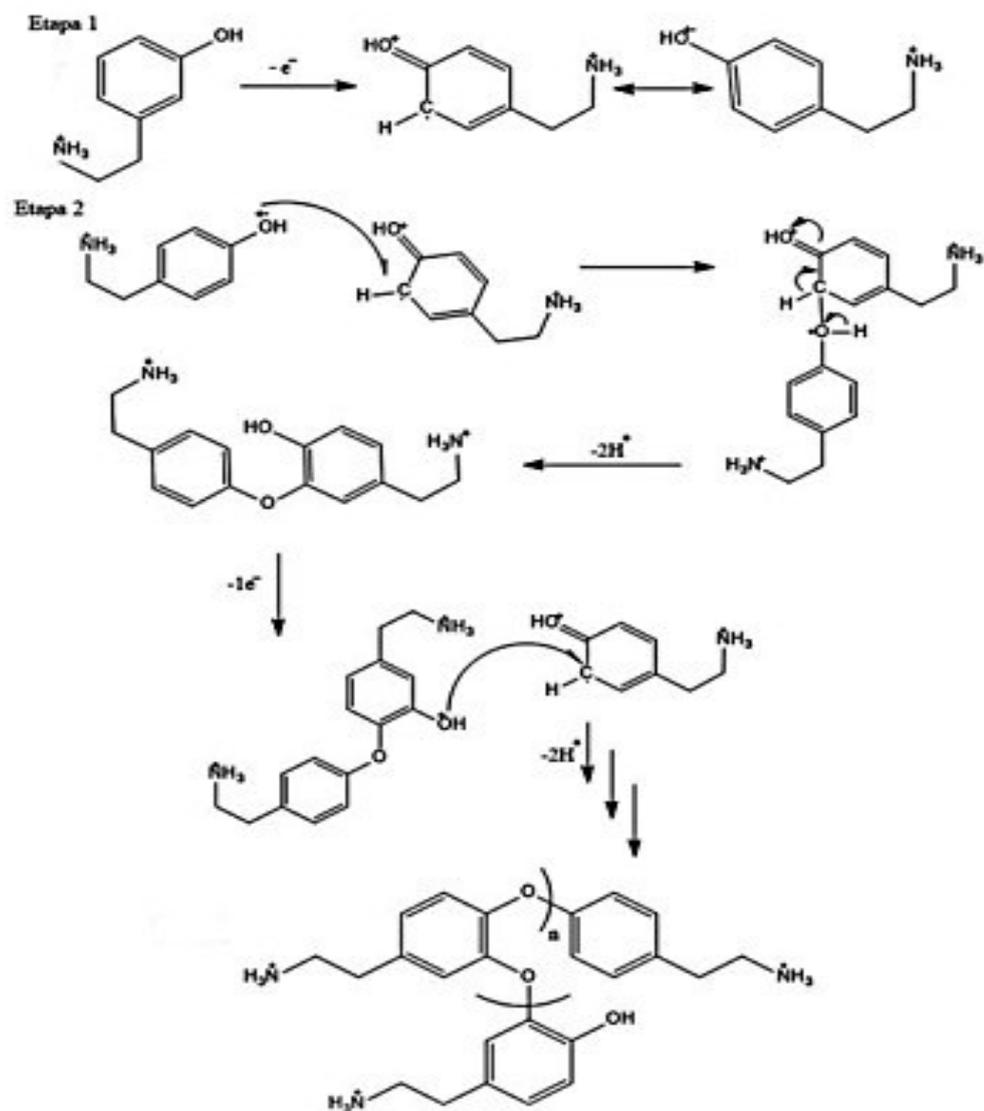


Fonte: Adaptado^[38].

1.3.1 Tiramina (C₈H₁₁NO)

A molécula de tiramina é o monômero utilizado para a obtenção de filmes finos de politiramina {poli-[4-(2-aminoetil)fenol]}. No mecanismo de polimerização em meio ácido da tiramina ocorre a formação do cátion radical após a oxidação eletroquímica do monômero, seguida de um acoplamento do cátion radical pelo carbono aromático e oxigênio fenólico, com a posterior formação de uma ligação éter, seguida da perda de dois prótons para a reconstituição da aromaticidade^[39]. A formação de filmes poliméricos de tiramina é favorecida em pH ácido resultando na produção de películas mais espessas e com melhores propriedades de condução do que os filmes obtidos em condições alcalinas ou neutras^[40]. A Figura 10 ilustra o mecanismo de polimerização em meio ácido da tiramina.

Figura 10: Mecanismo de eletropolimerização da tiramina em meio ácido



Fonte: [39]

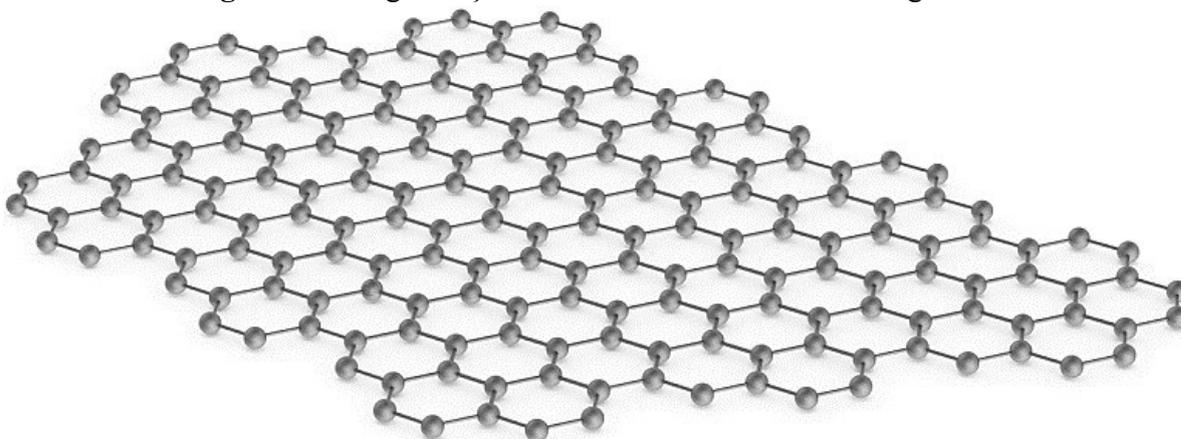
1.4 Aplicação de nanomateriais em biossensores

A utilização de materiais em escala nanométrica para a construção de biossensores possui o intuito de melhorar suas condições de sensibilidade e área superficial disponível para o ancoramento de bioreceptores. Nesse aspecto, destaca-se a utilização do Grafeno^[41].

1.4.1 Grafeno

O Grafeno é um alótropo carbonáceo bidimensional, isto é, um material derivado do carbono, cujos átomos estão ligados covalentemente em uma organização hexagonal (Figura 11). Possui elevada área superficial, excelente condutividade eletrônica e biocompatibilidade, tornando-se um nanomaterial com características interessantes para aplicação em biossensores^[42,43].

Figura 11: Organização tridimensional dos átomos de grafeno.



Fonte:^[44]

Diferentes métodos de produção de grafeno são conhecidos: exfoliação mecânica do grafite, crescimento de grafeno por deposição química a vapor e oxidação química do grafite seguida de exfoliação, sendo este último o mais utilizado devido ao rendimento reacional^[45].

A oxidação do grafite é obtida mediante utilização de agentes oxidantes fortes (permanganato de potássio e nitrato de sódio) que promovem a expansão das camadas constituintes do grafite, formando um material rico em grupos funcionais oxigenados, denominado Óxido de Grafeno (OG). A presença desses grupos oxigenados acaba distorcendo a nuvem de elétrons π , diminuindo sua condutividade eletrônica, logo realiza-se uma redução eletroquímica deste material, para eliminar (ou diminuir) a fração dessas espécies oxigenadas^[45]. A redução eletroquímica apresenta como características positivas a praticidade de se realizar sobre a superfície do eletrodo, rapidez e metodologia simples que não utiliza reagentes redutores perigosos, como a hidrazina (N_2H_4), reagente corrosivo e inflamável^[46].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Construir um imunossensor eletroquímico para detecção do antígeno troponina I (TnIc) a partir de eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito óxido de grafeno reduzido/politiramina (OGr/PTir).

2.2 Objetivos Específicos:

*Construir e caracterizar eletroquimicamente eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito OGr/PTir;

*Caracterizar eletroquimicamente os eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito de OGr/PTir em cuja superfície realizaram-se as etapas de: imobilização do anticorpo anti troponina I, bloqueio com solução de BSA e formação do imunocomplexo com o antígeno troponina I;

- * Caracterizar morfologicamente o imunossensor, na ausência e presença do analito;
- * Construir uma curva de calibração usando soro enriquecido com TnIc;
- * Avaliar a estabilidade do imunossensor;
- * Estudar a especificidade do imunossensor;
- * Avaliar a capacidade de regeneração do imunossensor;
- * Analisar a capacidade de diferenciação do imunossensor frente a amostras de soro de pacientes saudáveis (não acometidos por IAM) e doentes (acometidos por IAM).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos, reagentes e soluções

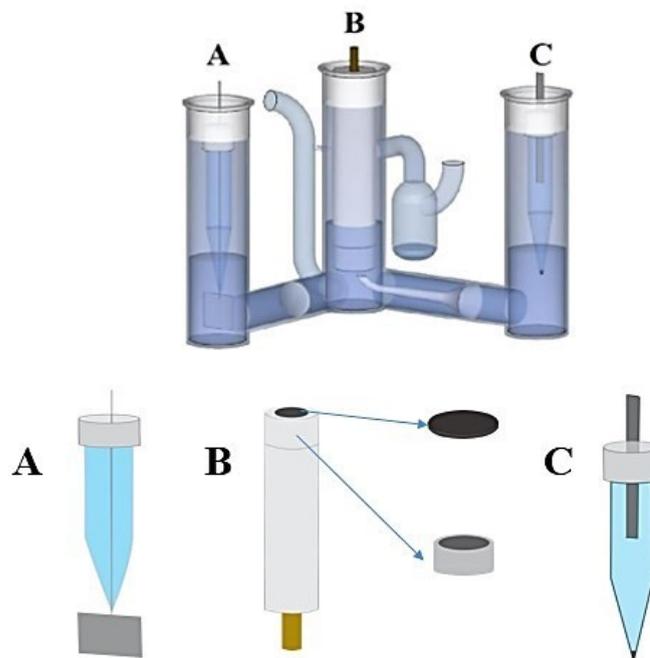
Prepararam-se todas as soluções utilizadas neste trabalho com água deionizada ultrapura (resistividade= 18,2 MΩ cm, Gehaka) e desoxigenaram-se as mesmas com gás nitrogênio (N₂). As concentrações e volumes utilizados das soluções encontram-se dispostos ao longo do texto. A Tabela 1 indica os reagentes de padrão analítico empregados no preparo das soluções.

Tabela 1: Reagentes utilizados

Reagentes	Fórmula Química	Fonte	Pureza (%)
Ácido perclórico	HClO ₄	Merck	37
Ácido tetracloroáurico (III) tri hidratado	HAuCl ₄ .3H ₂ O	Sigma	49
Citrato de sódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Synth	99
Cloreto de potássio	KCl	Neon	99
Cloreto de sódio	NaCl	Synth	99
Ferricianeto de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Vetec	99
Ferrocianeto de potássio	K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O	Reagen	99
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	Synth	99
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄	Synth	99
Cloridrato de tiramina	C ₈ H ₁₂ CINO	Acros Organics	98
Nitrato de prata	AgNO ₃	Acros Organics	98

Em todos os ensaios eletroquímicos utilizou-se uma célula eletroquímica de três compartimentos (Figura 12), com capacidade volumétrica de 25 mL, como eletrodo de referência e contra-eletrodo empregou-se Ag/AgCl (KCl 3 mol/L) e placa de platina, respectivamente.

Figura 12: Representação esquemática da célula de três compartimentos sendo (A) eletrodo auxiliar de platina, (B) eletrodo de trabalho de grafite e (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl.



Fonte: Adaptado ^[47]

3.2 Tratamento de dados

Todos os dados obtidos durante a realização deste trabalho foram tratados e plotados na forma de voltamogramas, histogramas ou equação de reta utilizando-se o software Origin® 7. As análises realizadas por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foram feitas em triplicatas, realizando-se o cálculo de suas médias aritméticas e desvio padrão.

3.3 Reagentes e amostras biológicas

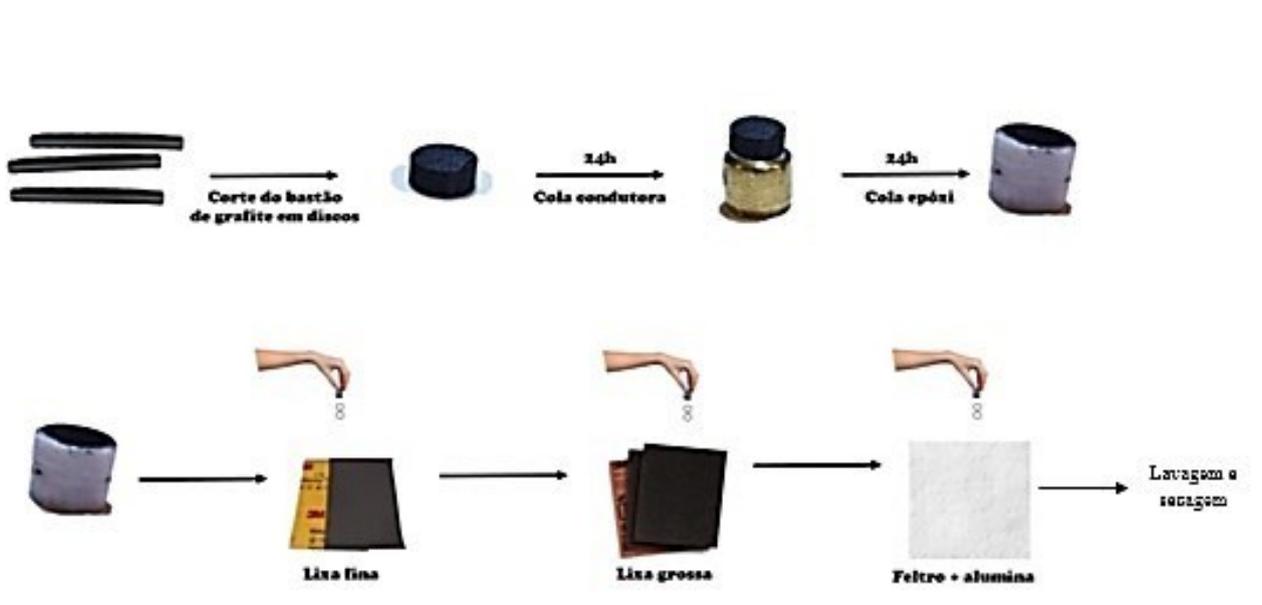
O anticorpo anti troponina I cardíaca (1 mg/mL) foi adquirido da empresa Invitrogen. O antígeno troponina I cardíaca (2×10^4 ng) foi adquirido da empresa Sigma Aldrich e ressuspendido em tampão fosfato de sódio, resultando em uma solução final de concentração igual a $4 \cdot 10^4$ ng/mL, que por sua vez foi diluída em diferentes concentrações e utilizada nesse trabalho. Utilizou-se o antígeno troponina I para enriquecer amostras de soro de um paciente saudável em diferentes concentrações. Amostras de pacientes doentes (acometidos por IAM) foram cedidas pelo laboratório SABIN de Uberlândia.

3.4 Etapas para a construção do imunossensor

3.4.1 Preparo do eletrodo de grafite (EG)

Utilizou-se grafite como eletrodo de trabalho, adquiridos comercialmente da empresa Alfa Aesar (99,9995%). Os eletrodos consistem em discos de carbono com diâmetro de 6mm e espessura variante entre 3 e 4 mm. Fixou-se estes discos sobre a superfície de um cilindro metálico utilizando-se uma cola condutora, composta de 70% de flocos de prata e 30% de cola epóxi (Araldite[®]). Após o tempo de secagem da cola condutora (24 horas), encaixou-se estes discos em bases de Teflon[®] e os espaços vazios foram preenchidos com Araldite[®]. Esperou-se novamente 24 horas para a secagem total da cola epóxi, poliu-se os eletrodos em lixas d'água com diferentes granulações (400 e 1200 cm⁻²) para nivelamento da superfície e para garantir um polimento ainda mais fino, utilizou-se uma suspensão aquosa de alumina (0,3 μm) sobre uma superfície lisa, recoberta com feltro umedecido em água deionizada. Para a remoção do excesso de alumina, realizou-se um banho ultrassônico com água deionizada por 6 minutos, com trocas de água deionizada a cada 2 minutos. Por fim, secou-se cada um dos eletrodos com gás nitrogênio, conforme indica a Figura 13.

Figura 13: Metodologia de preparo dos eletrodos de trabalho, envolvendo corte, colagem e polimento.



Fonte: Adaptado^[48]

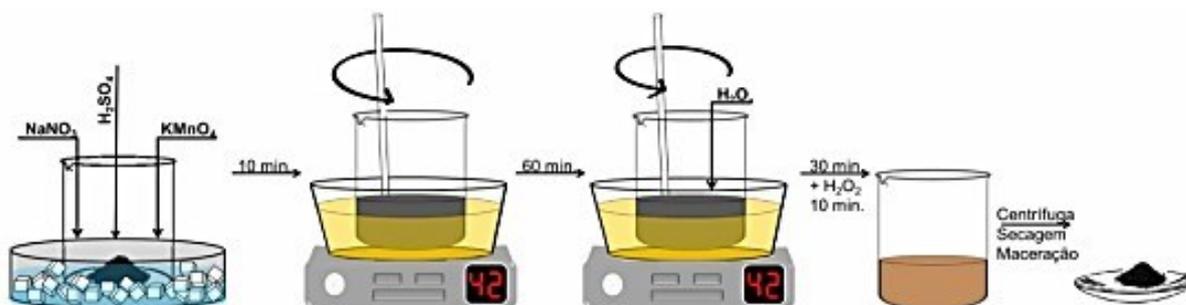
3.4.2 Caracterização eletroquímica primária por Voltametria Cíclica (VC) do eletrodo de grafite (EG)

Após a etapa de polimento, submeteram-se os eletrodos a uma caracterização eletroquímica primária por VC em solução de 0,5 mol/L de ácido perclórico (HClO_4) como eletrólito suporte para posterior padronização da área superficial dos eletrodos. Utilizou-se como parâmetro eletroquímico uma janela de potencial de 0,00 V a + 1,20 V (4 ciclos de varredura), na velocidade de 50 mV/s.

3.4.3 Redução eletroquímica de Óxido de Grafeno (OG) sobre a superfície do eletrodo de grafite (EG)

Após a etapa anteriormente descrita, gotejou-se 20 μL de uma suspensão de óxido de grafeno (OG) (1mg/mL), na superfície de cada eletrodo de trabalho, secou-se por 20 minutos em estufa na temperatura de 55°C e realizou-se um ensaio de redução eletroquímica por VC, utilizando-se tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,4) como eletrólito suporte, sendo a janela de potencial fixa entre 0,00 V a - 1,50 V, com velocidade de varredura de 50 mv/s, sob 10 ciclos de varredura. Obteve-se a suspensão de OG mediante utilização de 1 mg de OG e 1000 μL de água deionizada acondicionados em microtubos do tipo *eppendorf*, submetido a um banho ultrassônico durante 20 minutos. Ressalta-se que o OG utilizado foi previamente sintetizado por integrantes do grupo de pesquisa BIOSENS seguindo uma modificação do método de Hummers^[49]. O esquema de síntese utilizado está ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Esquema de síntese do Óxido de Grafeno (OG).



Fonte: Adaptado^[49].

3.4.4 Eletropolimerização do monômero Tiramina sobre o eletrodo de grafite (EG) funcionalizado com óxido de grafeno reduzido (OGr)

Os eletrodos de grafite funcionalizados com OGr, foram submetidos a eletropolimerização usando solução monomérica de tiramina, solubilizada em uma solução de

HClO₄ (2,5 mmol/L) por voltametria cíclica, na faixa de potencial de 0,00 V a + 1,10 V, velocidade de varredura de 50 mV/s, 20 ciclos.

3.4.5 Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica (VC) do eletrodo de grafite (EG) funcionalizado com óxido de grafeno reduzido (OGr) e eletropolimerizado com tiramina (EG/PTir)

Para eliminação de eventuais resíduos de monômero na superfície do eletrodo realizou-se mais uma VC em HClO₄ (0,5mol/L) utilizando-se os mesmos parâmetros descritos no item 3.4.2.

3.4.6 Imobilização do anticorpo anti troponina I

Após a modificação dos eletrodos com o nanocompósito, gotejou-se 10 µL do anticorpo anti troponina I (1 µg/mL) sobre o eletrodo de grafite modificado e acondicionou-se os mesmos em recipiente hermeticamente fechado durante 30 minutos em uma temperatura de 22°C. A otimização do tempo de imobilização foi estudado pelo grupo de pesquisa LAFIP – BIOSENS [49]. Após esse tempo, lavou-se com 50 µL de solução tampão fosfato, (0,1 mmol/L, pH 7,4) repetindo-se esse processo por 3 vezes. Secou-se delicadamente a superfície de cada eletrodo com gás nitrogênio.

3.4.7 Aplicação da solução de bloqueio albumina de soro bovino (BSA)

Gotejou-se 30 µL de uma solução de bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 0,5% solubilizada em tampão fosfato (0,1 mmol/L, pH 7,4) ao bioeletrodo grafite/GOr/PTir/anti TnIc e repetiram-se as condições de acondicionamento, lavagem e secagem indicadas no item 3.4.6.

3.4.8 Incubação com o antígeno troponina I

Para a formação do imunocomplexo (anti TnIc:TnIc), utilizou-se 10 µL de uma solução na diluição 1:1 contendo soro de paciente saudável enriquecido com o analito (antígeno troponina I) em diferentes concentrações. Repetiram-se as condições de acondicionamento, lavagem e secagem anteriormente especificadas. Na sequência realizaram-se detecções indiretas eletroquímicas foram conduzidas por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) utilizando-se a sonda redox ferro/ferricianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]).

3.4.9 Análises morfológicas

Análises da morfologia do eletrodo de grafite modificado com o nanocompósito (OGr-Ptir) nas etapas de adsorção de sonda, bloqueio da superfície, interação com alvo positivo e interação com alvo negativo por meio das técnicas de MFA (Microscopia de Força Atômica) e MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura).

3.4.10 Ensaio de especificidade

Adicionou-se 10 µL de soro de paciente saudável enriquecido com diferentes espécies [troponina T, T₃ (hormônio triiodotironina), proteína C reativa (PCR)] na concentração de 4 ng/mL sobre o bioeletrodo (EG/OGr/PTir/anti TnIc). Repetiram-se as condições de condições de acondicionamento, lavagem e secagem descritas no item 3.4.6 e realizaram-se detecções indiretas eletroquímicas por meio da voltametria de pulso diferencial (VPD) utilizando-se a sonda redox ferro/ferricianeto de potássio.

3.4.11 Curva de calibração

Para a obtenção da curva de calibração do imunossensor, 10 µL do soro de um paciente saudável foi enriquecido com diferentes concentrações do antígeno troponina I (0,002; 0,006; 0,08, 1, 2, 4 ng/mL) e realizaram-se medidas de VPD. Realizou-se uma regressão linear dos resultados, obtendo-se uma equação de reta, cujo coeficiente angular (s) utilizou-se tanto para o cálculo do limite de quantificação (LQ, Equação 2) quanto para o cálculo do limite de detecção (LD, Equação 3). Delta (δ) refere-se ao desvio padrão do branco (EG/OGr/PTir/antiTnIc).

Equação 2: $LD = \frac{3\delta}{s}$

Equação 3: $LQ = \frac{10\delta}{s}$

Definiu-se ainda o limite máximo de detecção do imunossensor, mediante enriquecimento de uma amostra de soro de paciente saudável com uma concentração elevada de troponina I e avaliou-se seu comportamento por medidas de VPD.

3.4.12 Estabilidade

A fim de se investigar a estabilidade dos bioeletrodos ao longo do tempo, acondicionou-

se os mesmos a 10°C durante 40 dias. Para as medidas, realizadas a cada 10 dias, incubou-se o bioeletrodo com 10 µL de soro de paciente saudável enriquecido com 1 ng/mL de troponina I e submeteu-se a técnica eletroquímica VPD.

3.4.13 Diferenciação entre pacientes saudáveis e doentes

Adicionou-se 10 µL de soro na superfície dos bioeletrodos (EG/OGr/PTir/anti-TnIc) bloqueados com BSA. Repetiram-se as condições de acondicionamento, lavagem e secagem anteriormente especificadas no item 3.4.6 e realizaram-se detecções eletroquímicas indiretas por meio da técnica de VPD utilizando-se a sonda redox ferro/ferricianeto de potássio.

3.4.14 Protocolo de regeneração dos eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito (EG/OGr/PTir) após as análises de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Após a realização das detecções eletroquímicas por VPD, realizou-se um protocolo para a regeneração dos bioeletrodos^[50], com a adição de 30 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) na concentração de 1% (v/v), durante 3 minutos, sobre a superfície dos eletrodos, lavou-se com 150 µL de tampão fosfato de sódio (0,1 mmol/L, pH 7,4) e secou-se delicadamente com N₂. Adicionou-se 10 µL de soro de um paciente acometido por infarto do miocárdio e incubou-se por 30 minutos, após esse tempo, repetiu-se a lavagem com tampão fosfato de sódio, secagem com N₂ e realizou-se uma nova VPD.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Polimento dos eletrodos de grafite

A Figura 15 ilustra a superfície do eletrodo de grafite visto a olho nu antes (A) e depois (B) do polimento.

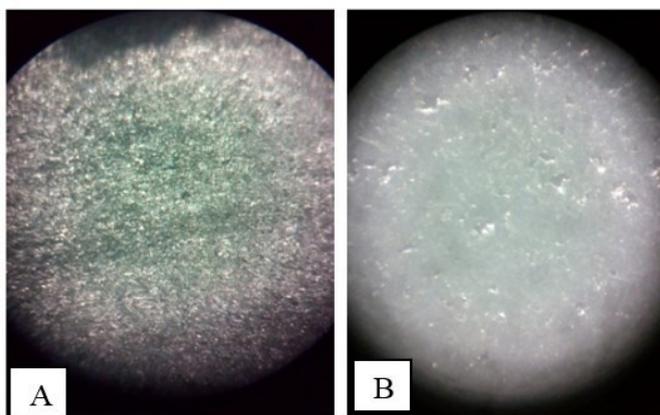
Figura 15: Visualização dos eletrodos de trabalho a olho nu antes (A) e após (B) a etapa de polimento.



Fonte: A autora.

Observa-se uma nítida diferença entre eles, sendo que o eletrodo polido apresenta uma diminuição da altura do grafite e maior uniformidade da superfície. A Figura 16 corresponde a visualização dos eletrodos antes (A) e depois (B) do polimento em estereomicroscópio (Optron, TIM2T) com ampliação de 4 vezes.

Figura 16: Superfície do grafite antes do polimento (A) e após o polimento (B) vistas em microscópio (ampliação de 4 vezes).



Fonte: A autora.

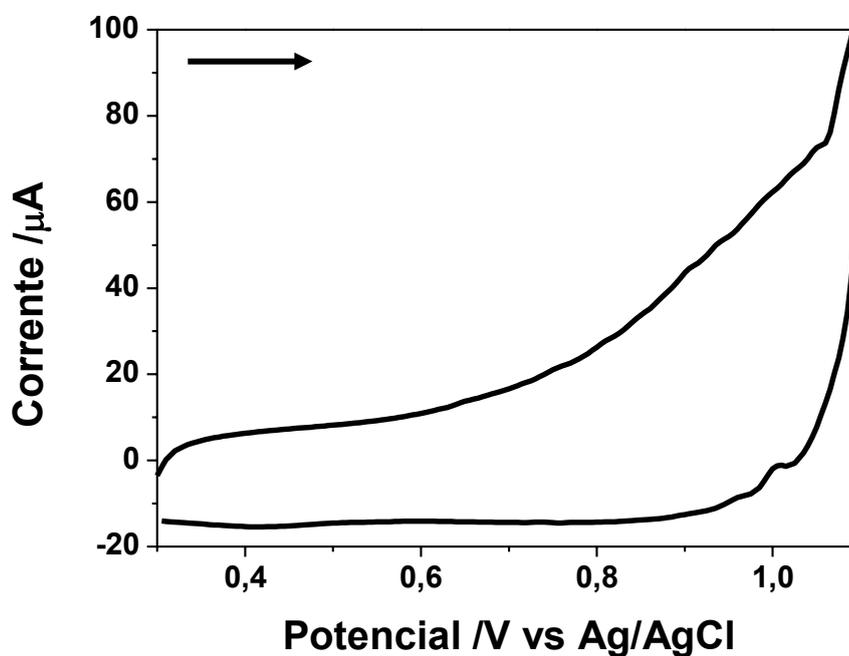
Após a etapa de polimento, observa-se melhor uniformidade da superfície do grafite pois sendo o grafite um material poroso, o polimento é necessário para o melhor desempenho dos eletrodos nas análises.

4.2 Ensaios eletroquímicos referentes a funcionalização dos eletrodos de grafite (EG) com o nanocomposto de Óxido de Grafeno reduzido (OGr) e politiramina (EG/OGr/ PTir)

4.2.1 Escolha dos eletrodos de trabalho (ET)

A Figura 17 indica o voltamograma obtido por voltametria cíclica (VC) em HClO_4 (0,5 mol/L), sendo a seta indicativa do sentido da varredura.

Figura 17: Voltamograma Cíclico do eletrodo de grafite (EG) em eletrólito suporte HClO_4 0,5 mol/L com velocidade de 50 mV/s, varredura no sentido direto.



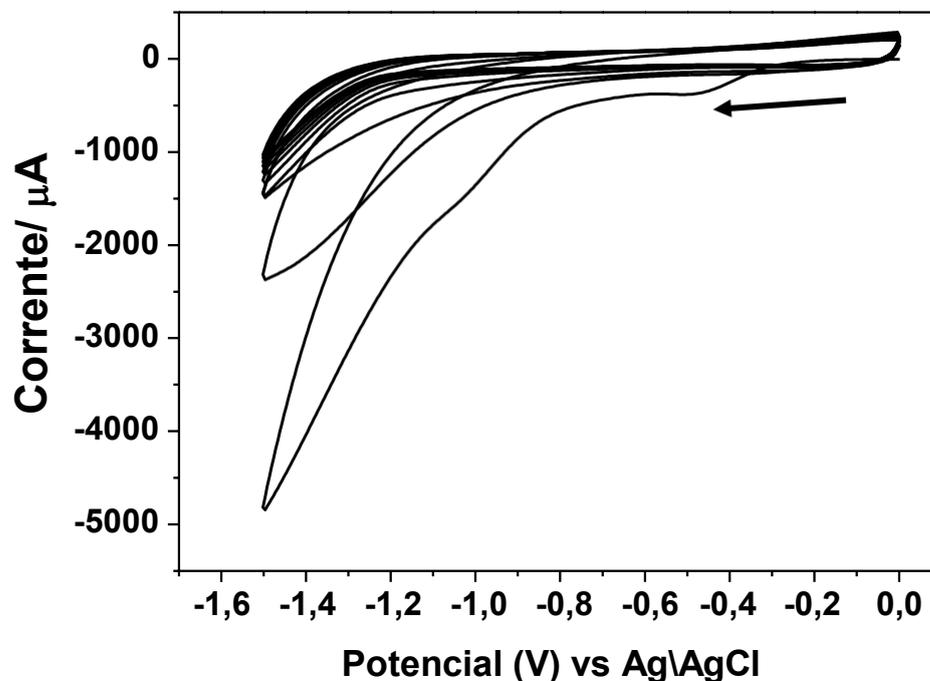
Fonte: A autora.

A realização desta voltametria cíclica inicial tem como intuito a remoção de impurezas e interferentes adsorvidos na superfície do EG, além de padronizar o perfil eletroquímico do eletrodo.

4.2.2 Redução eletroquímica do óxido de grafeno (OG)

A Figura 18 mostra a voltametria cíclica realizada para a redução do OG utilizando-se tampão fosfato (pH= 7,4; 0,1 mol/L) como eletrólito suporte, sendo a seta indicativa do sentido da varredura.

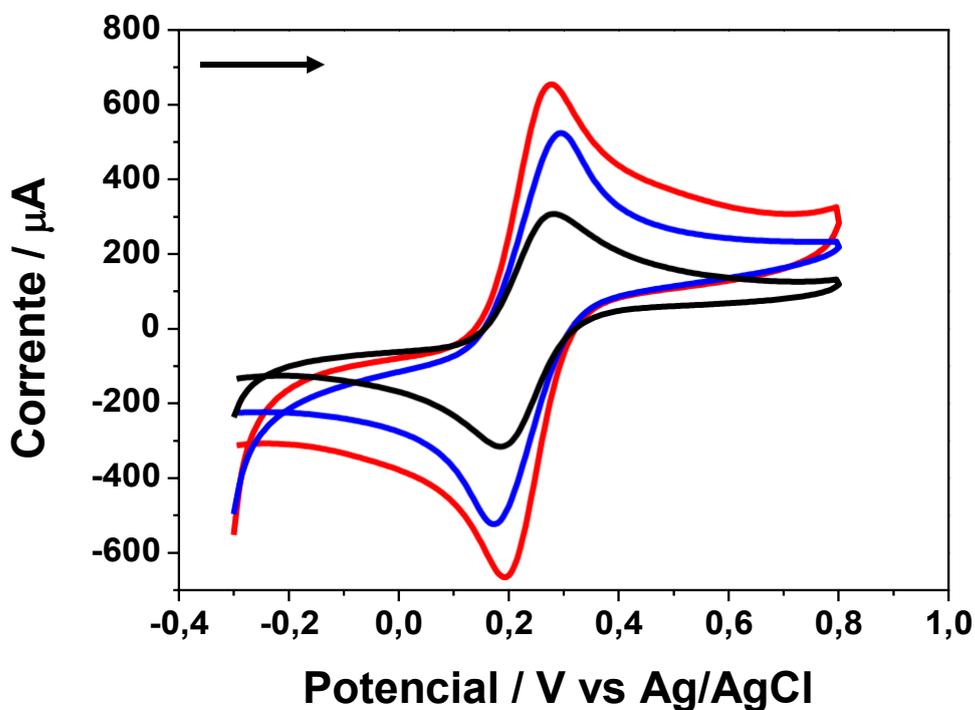
Figura 18: Redução eletroquímica por voltametria cíclica do Óxido de Grafeno (OG) na superfície do eletrodo de grafite em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, entre 0,0 a -1,5 V, 10 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV/s. Varredura no sentido indireto.



Fonte: A autora.

O óxido de grafeno (OG) apresenta propriedades isolantes devido a presença dos inúmeros grupos funcionais oxigenados em sua estrutura, que diminuem a sua aromaticidade, observando-se uma deformação de sua nuvem π de elétrons, porém quando submetido a um processo de redução, observa-se a remoção/diminuição de seus grupos oxigenados, transformando-o em uma espécie semicondutora ^[40]. A Figura 19 relaciona os voltamogramas obtidos comparando eletrodos sem deposição de OG, com deposição de OG e com deposição de OGr, sendo a seta indicativa do sentido da varredura.

Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol/L) e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre - 0,4 V e 1,0 V. Em (—) EG, (—) EG/OG e (—) EG/OGr. Varredura no sentido direto.



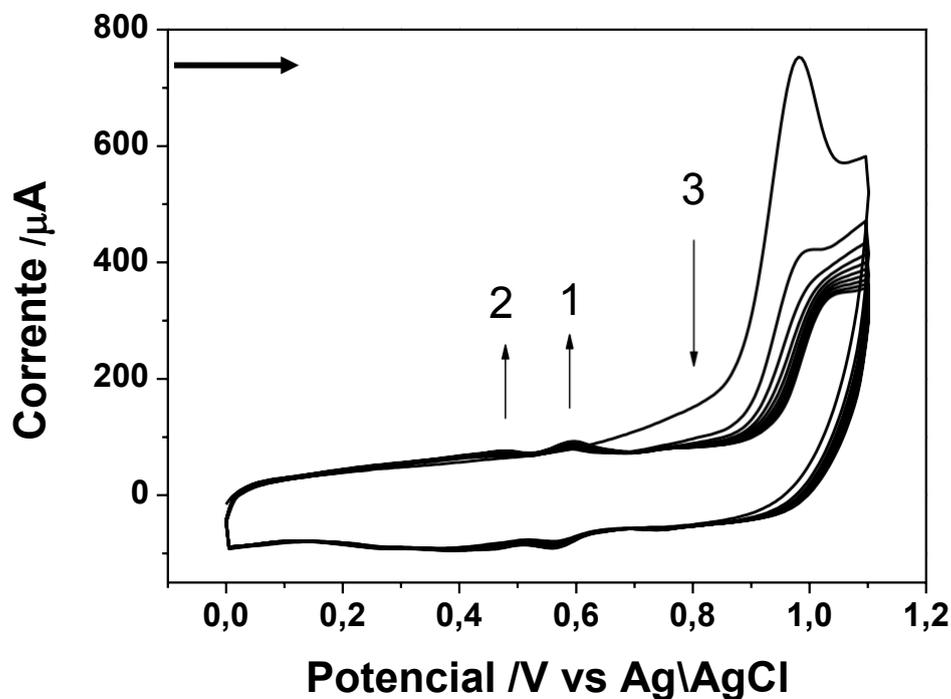
Fonte: A autora.

A análise da Figura 19 indica um aumento das correntes de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}) no voltamograma de EG/OGr (—) quando comparado aos voltamogramas de EG (—) e EG/OG (—) evidenciando assim o caráter condutor do OG quando submetido a redução, devido a eliminação/ diminuição dos grupos oxigenados, sendo assim, a aplicação de OGr em eletrodos de grafite tem como objetivo melhorar sua condutividade elétrica^[40].

4.2.3 Eletropolimerização do monômero tiramina

A Figura 20 ilustra o voltamograma cíclico referente a eletropolimerização do monômero tiramina em eletrodos de grafite modificados com OGr, na faixa de potencial entre 0 e +1,1 V, sendo o monômero solubilizado em $HClO_4$ (0,5 mol/L) e aplicando-se 20 ciclos de varredura de potencial com velocidade de 50 mV/s, onde a seta indica o sentido da varredura.

Figura 20: Polimerização eletroquímica da tiramina (2,5 mmol/L) em HClO₄ (0,5 mol/L) com varredura de 20 ciclos a 50 mV/s entre 0,0V a +1,1V. Varredura no sentido direto.

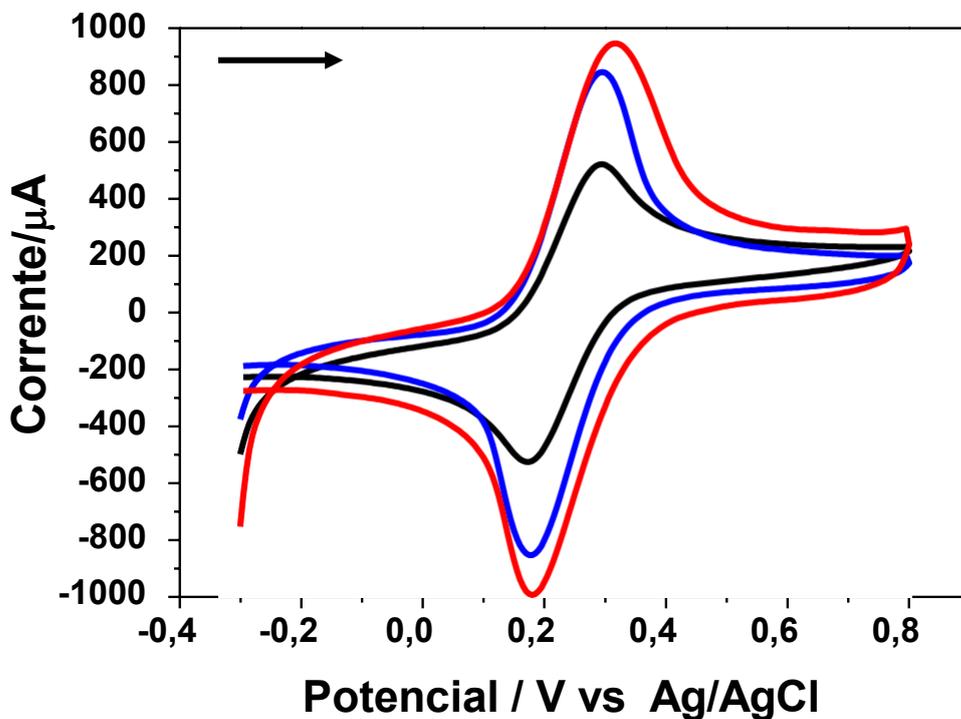


Fonte: A autora.

Analisando-se a Figura 20 observam-se três picos característicos nesse processo: na faixa de +0,85 V, com a oxidação inicial do monômero, ocorrendo a formação do cátion radical para a propagação da eletropolimerização (21 -3) e o aparecimento (seguido de crescimento) de picos de oxidação em +0,60 V (Figura 21- 1) e +0,45 V e de redução nos mesmos valores observando-se a varredura inversa (Figura 21- 2), havendo assim o crescimento de um material eletroativo sobre a superfície do EG modificado com OGr.

Com o propósito de investigação das propriedades eletrônicas da plataforma, realizou-se uma nova VC em três tipos de eletrodos: eletrodos de grafite modificados com OGr e eletropolimerizados com tiramina (EG/OGr/PTir), eletrodos de grafite sem modificação (EG) e eletrodos de grafite apenas eletropolimerizados com tiramina (EG/ PTir). Os perfis obtidos estão apresentados na Figura 21, sendo que a seta indica o sentido da varredura.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de 0,1 mol/L de KCl e $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol/L) com 50mV/s, entre -0,4V e 1,0V. Em (—) EG, (—) EG/PTir e (—) EG/OGr/PTir. Varredura no sentido direto.

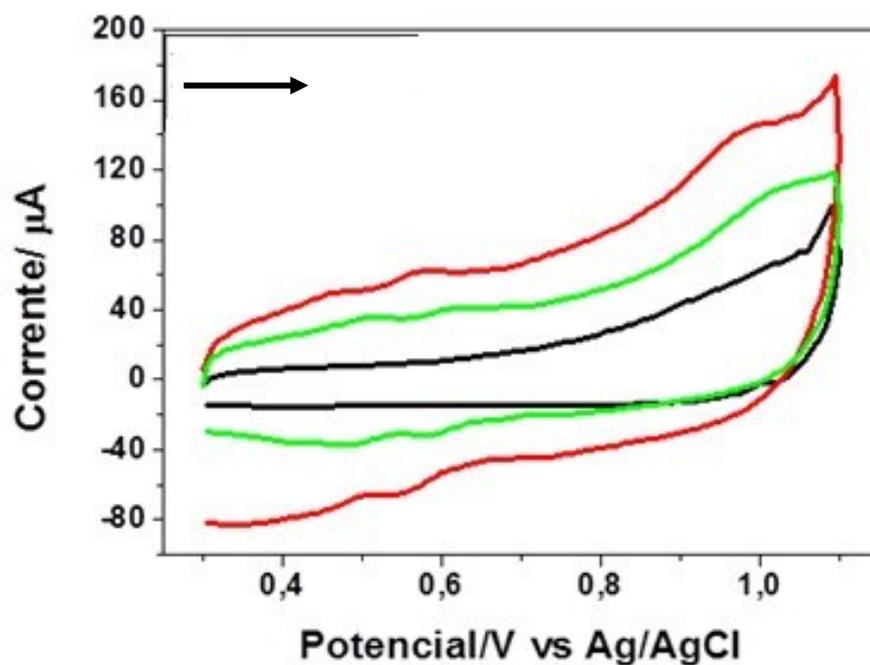


Fonte: A autora.

Analisando-se a Figura 21 observa-se o aumento das correntes de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}) para o eletrodo de grafite modificado com OGr e eletropolimerizado com tiramina, sendo favorecida a transferência eletrônica e, conseqüentemente, aumentando a condução de corrente. É possível também inferir sobre o caráter catiônico da plataforma em estudo, visto que a solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ é aniônica, logo observa-se atração eletrostática entre as mesmas, justificando também o maior valor de corrente observado.

A Figura 22 relaciona os perfis de voltametria cíclica obtidos referente a análise de um eletrodo de grafite sem modificação (EG), um eletrodo de grafite apenas eletropolimerizado com tiramina (EG/PTir) e um eletrodo de grafite modificado com OGr e eletropolimerizado com tiramina (EG/OGr/PTir), sendo a seta indicativa do sentido da varredura.

Figura 22: Voltametria cíclica em eletrólito suporte HClO_4 0,5 mol/L na velocidade de 50 mV/s entre 0,0V a +1,1V. Em (—) EG, (—) EG/PTir, (—) EG/OGr/PTir. Varredura no sentido direto.



Fonte: A autora.

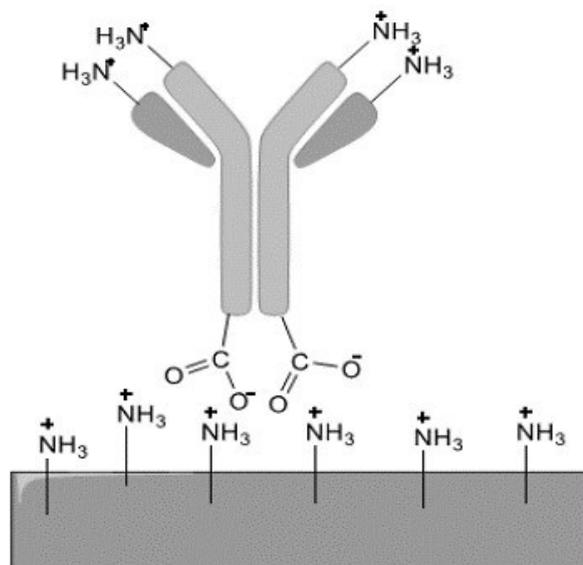
Com a análise da Figura 22, percebe-se que a utilização do nanocompósito eletrodo de grafite/OGr/PTir resultou também no aumento da área superficial dos eletrodos em que foi aplicado, favorecendo também a condução de corrente, sendo assim, justifica-se a utilização deste nanocompósito em eletrodos de grafite.

4.3 Construção do imunossensor

4.3.1 Imobilização e otimização da concentração do anticorpo anti troponina I (anti-TnIc)

A Figura 23 ilustra a possível orientação e imobilização do anticorpo anti-TnIc sobre a superfície EG/GOr/PTir.

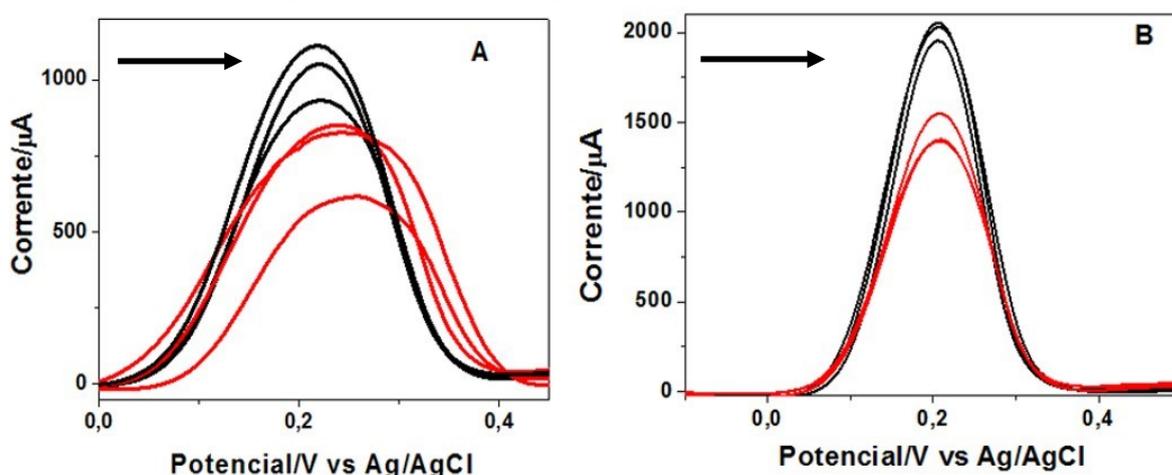
Figura 23: Representação da adsorção física do anticorpo anti-TnIc sobre EG/GOr/PTir



EG/OGre/PTir
Fonte: Silva, 2017 [40].

De acordo com a Figura 23 é possível que ocorra adsorção física devido a interação eletrostática dos grupos carboxílicos (COOH) do anticorpo com os íons amônio (NH_3^+) provenientes da politiramina resultando na orientação desejada da porção Fab e posterior formação do imunocomplexo. A Figura 24 mostra os voltamogramas de pulso diferencial (VPD) utilizando anti-TnIc em duas concentrações diferentes, com a seta indicando o sentido da varredura.

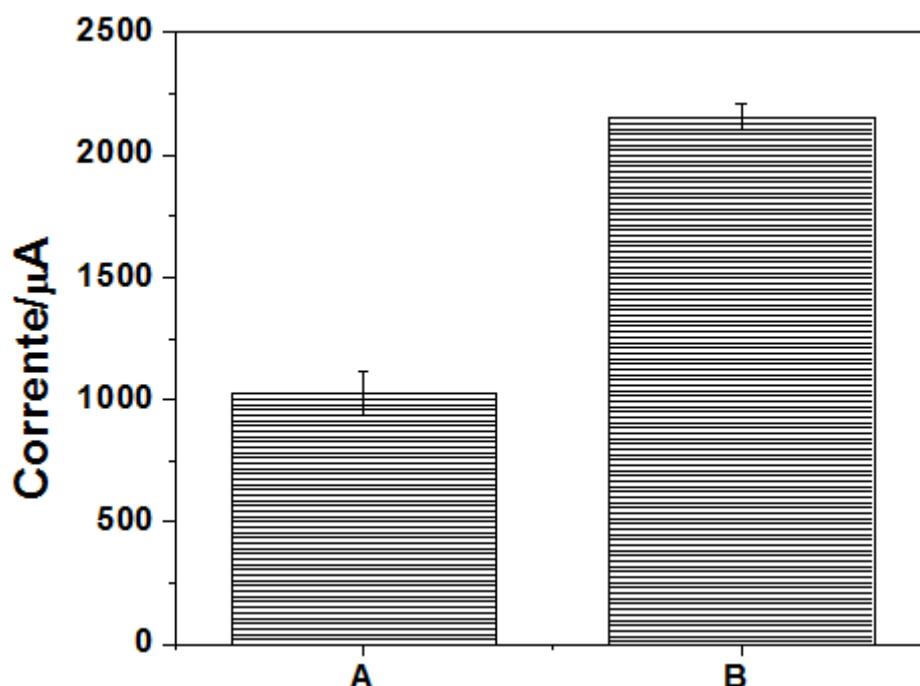
Figura 24: Voltamogramas de pulso diferencial em solução de 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s^{-1} contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol/L para EG/PTir/anti-TnIc na ausência (—) e presença de soro de paciente saudável enriquecido com 0,4 ng/mL de TnIc (—). (A) TnIc 10 $\mu\text{g/mL}$ e (B) TnIc 1 $\mu\text{g/mL}$. Varredura no sentido direto.



Fonte: A autora.

A Figura 24 indica que utilizando uma mesma concentração (0,4 ng/mL) de antígeno troponina I no soro de um paciente saudável diluído em tampão fosfato, o anti-TnIc na concentração 1 $\mu\text{g/mL}$, apresentou picos de oxidação mais bem definidos e reprodutíveis. Este resultado sugere que o impedimento estérico da superfície pode ter sido causado pela anti-TnIc em maiores concentrações, visto que o ancoramento das moléculas de anticorpo pode ser favorecido em concentrações menores. A Figura 25 mostra em forma de histograma os valores das correntes de pico dos voltamogramas da Figura 24.

Figura 25: Histogramas da resposta de corrente de pico usando anti-TnIc 10 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 1 $\mu\text{g/mL}$ (B).



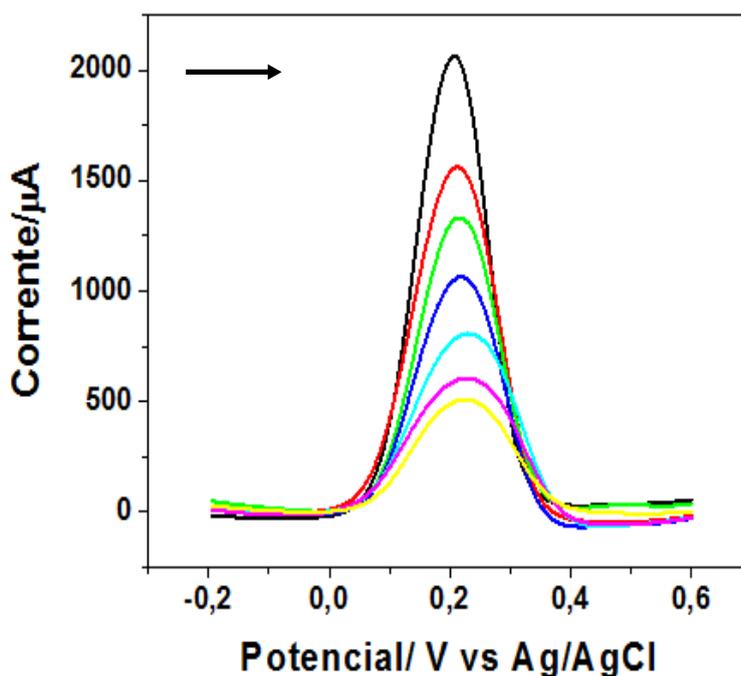
Fonte: A autora.

Com a análise da Figura 25 é possível observar valores de corrente duas vezes maiores na utilização da concentração 1 $\mu\text{g/mL}$ (B), sendo assim utilizou-se esta concentração para a construção do imunossensor. O desenvolvimento de um imunossensor para detecção de TnIc baseando-se na imobilização de anticorpos anti TnIc em microesferas que exigiram um maior tempo de incubação e maior concentração de anticorpo utilizado^[52], demonstrando que a metodologia simplificada para a imobilização do anticorpo é eficaz e eficiente.

4.3.3 Construção da curva de calibração

A Figura 26 mostra os voltamogramas para soro de paciente saudável (diluição 1:1 em tampão fosfato) enriquecido com TnIc em diferentes concentrações (0,002; 0,006; 0,08; 1; 2;4 ng/mL), sendo que a seta indica o sentido da varredura.

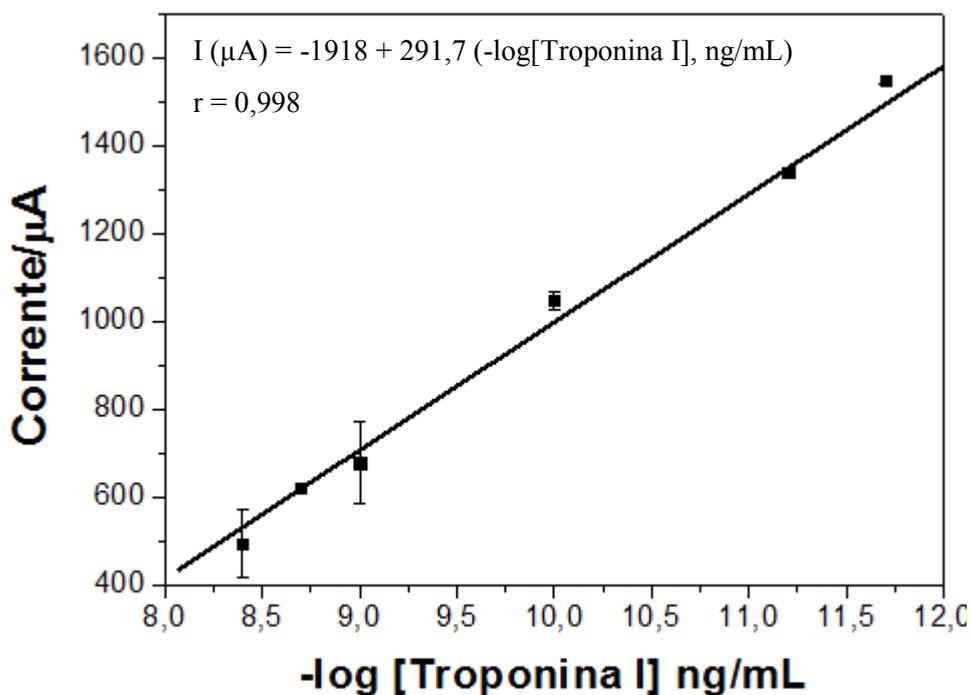
Figura 26: Voltametrias de pulso diferencial em solução de 0,1 mol/L de KCl contendo $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol/L, 50mV/s, faixa de potencial: -0,2V e 0,6 V, para EG/GOr/PTir/TnIc na ausência (—) e presença de soro humano enriquecido com diferentes concentrações de TnIc: 0,002 ng/mL (—), 0,006 ng/mL (—), 0,08 ng (—), 1 ng/mL (—), 2 ng/mL (—) e 4 ng/mL (—). Varredura no sentido direto.



Fonte: A autora.

Observa-se na Figura 26 uma relação inversa entre os valores de resposta de corrente em função do aumento na concentração de TnIc. Este decréscimo no valor de resposta de corrente pode ser devido a oxidação do par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ser dificultada frente a formação do imunocomplexo. O decréscimo no valor de corrente pode ser atribuído a uma alteração conformacional do imunocomplexo, com exposição da porção Fab do anticorpo e/ou promovendo seu distanciamento, causando redução da transferência de elétrons. Na Figura 27, demonstra-se a regressão linear de corrente/ μA versus o logaritmo das concentrações de TnIc, obtendo-se a equação da reta $I (\mu A) = -1918 + 291,7 (-\log[\text{Troponina I}], \text{ng/mL})$, $r = 0,998$.

Figura 27: Resposta linear e parâmetros da análise de regressão da curva analítica.



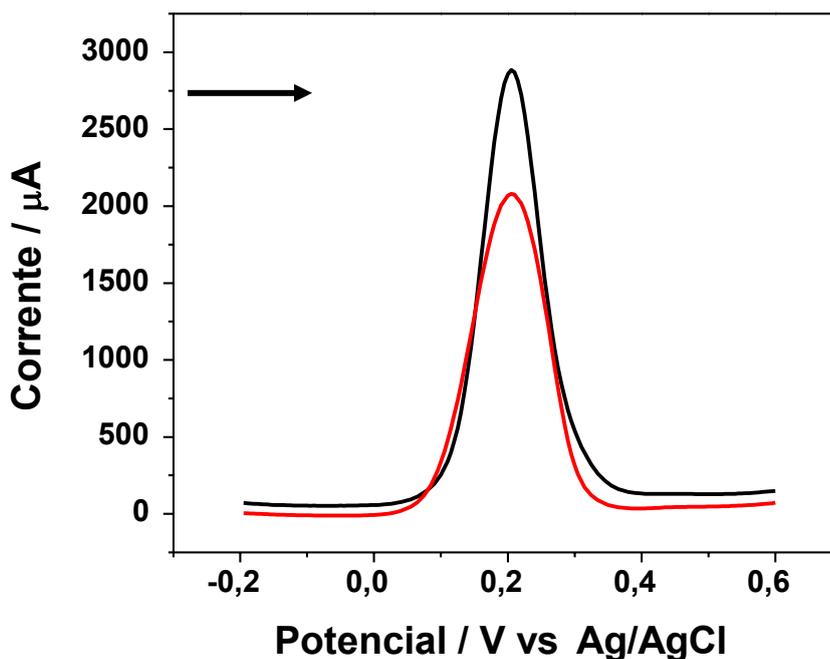
Fonte: A autora.

Os limites de detecção e quantificação são iguais a 0,2 ng/mL e 0,7 ng/mL, respectivamente, sendo a sensibilidade igual a 291,7 $\mu\text{A.mL.ng}^{-1}$. Os cálculos realizados compreendem: $LD = (3 \cdot \sigma) / S = (3 \cdot 20,50 \mu\text{A}) / 291,7 \mu\text{A/ng/mL} = 0,2 \text{ ng/mL}$ e $LQ = (10 \cdot \sigma) / S = (10 \cdot 51,45 \mu\text{A}) / 291,7 \mu\text{A.mL.ng}^{-1} = 0,7 \text{ ng/mL}$, sendo o desvio padrão do branco (σ) = 20,50 μA e Coeficiente angular da reta (S) = 291,7 $\mu\text{A.mL.ng}^{-1}$.

O valor do limite de detecção alcançado nesse trabalho mostra-se sensível e condizente com dados encontrados na literatura, conforme indicado no estudo de Periyakaruppan *et al.* [53] que alcançou o mesmo limite de detecção utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) como técnica de detecção. Este resultado mostra-se promissor, visto que todas as análises foram feitas em soro humano, uma amostra extremamente complexa devido a presença de interferentes, e conseguiu-se um LD da ordem de nanogramas utilizando-se um volume mínimo de amostra (10 μL).

Realizou-se um estudo referente a concentração máxima de antígeno troponina I que o imunossensor seria capaz de detectar cujo resultado encontra-se disposto na Figura 28, onde a seta indica o sentido da varredura.

Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial em solução de sonda aniônica ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol/L e 0,1 mol/L de KCl com 50mV/s, entre -0,1V e 0,5V. Em (—) anticorpo anti troponina I (sonda) e (—) antígeno troponina I na concentração (soro de paciente saudável enriquecido com 5 ng/mL, diluído em tampão fosfato de sódio pH=7,4). Varredura no sentido direto.



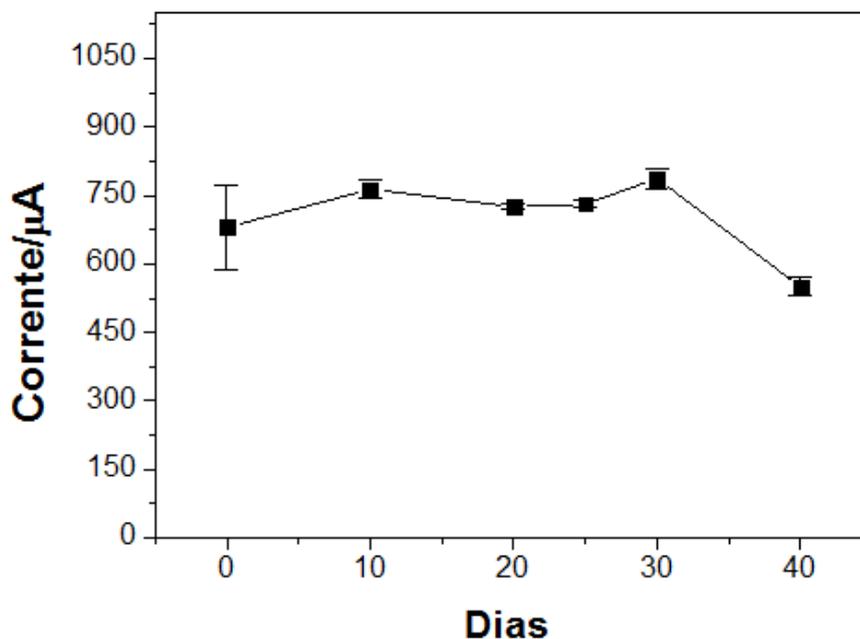
Fonte: A autora.

A análise da Figura 28 indica que em valores de concentração maiores ou igual a 5 ng/mL não há resposta do imunossensor sendo assim, infere-se que o limite máximo de detecção desse imunossensor é 4 ng/mL.

4.3.4 Estabilidade do imunossensor

Avaliou-se a estabilidade do imunossensor durante 40 dias (Figura 29) monitorando o pico do indicador redox por VPD. As medidas foram realizadas a cada 10 dias com a adição do soro de um paciente saudável enriquecido com 1 ng/mL de TnIc (diluição em tampão fosfato).

Figura 29: Estabilidade do imunossensor durante 40 dias.



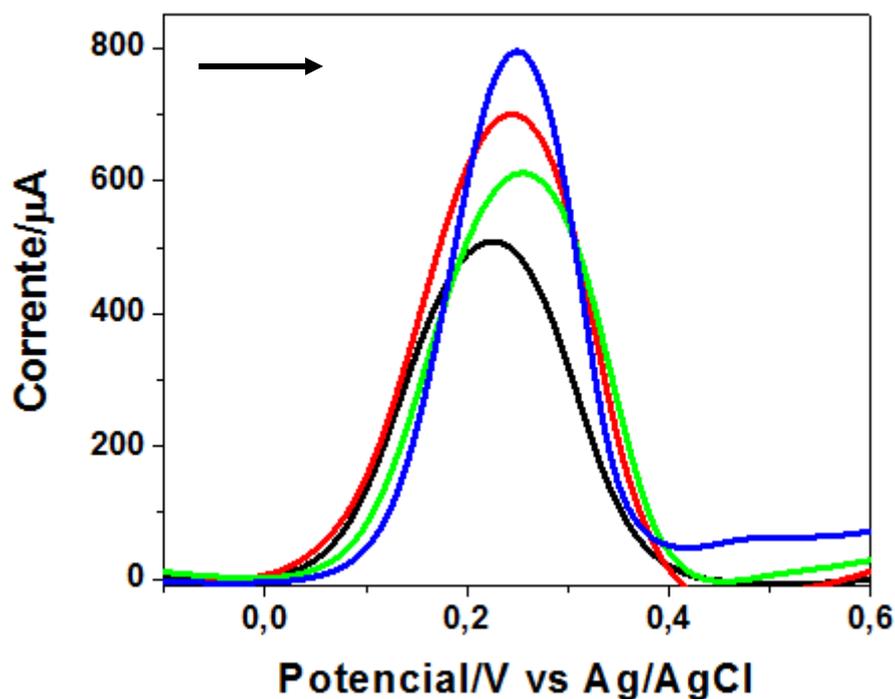
Fonte: A autora.

Observa-se com a análise da Figura 29 uma manutenção da resposta de corrente de 100% em 30 dias e 87% em 40 dias. A produção de um imunossensor eletroquímico para detecção de troponina I utilizando um nanocompósito de OGr e nanopartículas de ouro^[55] apresentou resultados semelhantes aos observados neste trabalho, cuja manutenção da resposta de corrente durou 30 dias.

4.3.5 Ensaio de seletividade

Com o intuito de avaliar o comportamento do imunossensor frente a espécies diferentes do analito troponina I, enriqueceu-se o soro de um paciente saudável com Troponina T, Proteína C-reativa e T₃ livre (triiodotironina) na concentração de 4 ng/mL e comparou-se com a resposta de Troponina I na mesma concentração, sendo o resultado indicado pela Figura 30, sendo a seta indicativa do sentido da varredura.

Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial para EG/OGr/anti-TnIc em solução de 0,1 mol/L de KCl contendo $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol/L com 50mV/s, entre -0,1 e 0,6 V. Em (—) Troponina T, (—) hormônio T_3 , (—) Proteína C-reativa e (—) Troponina I em soro de paciente saudável enriquecido com 4 ng/mL, diluído em tampão fosfato de sódio pH=7, 4. Varredura no sentido direto.



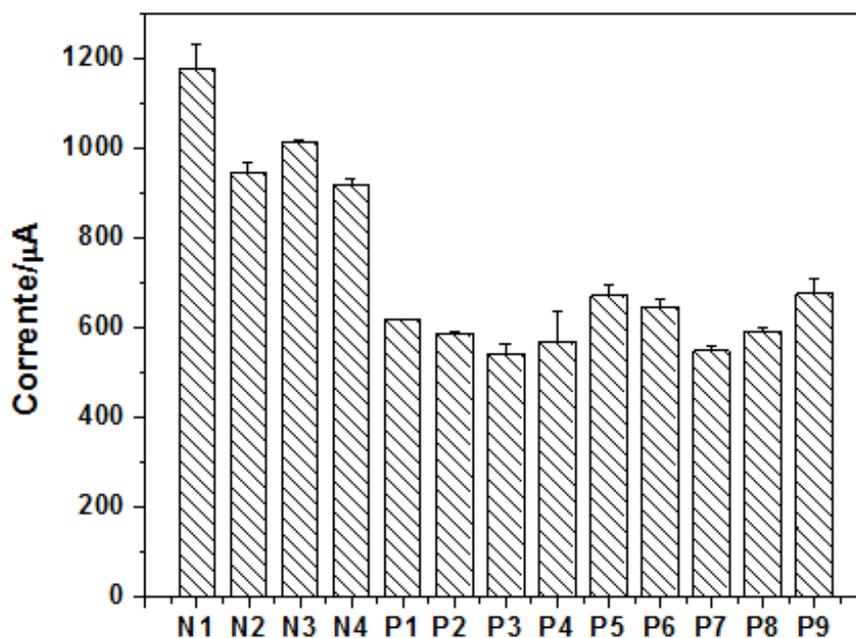
Fonte: A autora.

Com a análise da Figura 30 observou-se a resposta diferenciada entre as espécies analisadas, visto que estas apresentaram um maior valor de corrente quando comparadas a corrente gerada pela formação do imunocomplexo com a Troponina I, indicando que não houve ligação entre o anticorpo e os antígenos usados como controle negativo. Este resultado corrobora com a curva de calibração, onde observaram-se maiores valores de corrente em diminutas concentrações de antígeno troponina I, evidenciando a formação reduzida do imunocomplexo com exposição da porção Fab do anticorpo.

4.3.6 Diferenciação entre pacientes saudáveis e doentes

A Figura 31 mostra o histograma dos valores de corrente em função das amostras de soro de pacientes saudáveis (N1-N4) e pacientes acometidos por IAM (P1-P9).

Figura 31: Histograma relacionando os valores de corrente de pico obtidos na análise de amostras de soro de pacientes saudáveis (N1-N4) e pacientes acometidos por IAM (P1-P9).



Fonte: A autora.

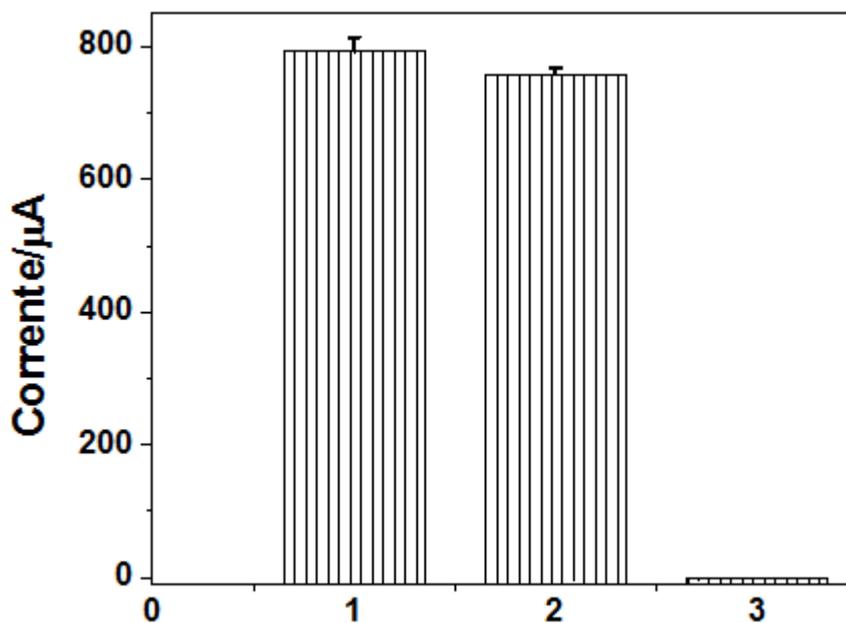
A análise da Figura 31 indica uma diferenciação da resposta de corrente entre os dois tipos de pacientes, onde pacientes saudáveis apresentaram maiores valores de corrente quando comparados aos pacientes infartados, corroborando com os demais resultados apresentados anteriormente, onde maiores valores de corrente são observados quando não existe a formação do imunocomplexo, favorecendo a oxidação do par redox.

4.3.7 Regeneração do imunossensor

Um imunossensor deve apresentar condições de reuso, a fim de economizar reagentes e possibilitar análises de baixo custo, sem que haja alteração relevante na sua reutilização ^[56].

A Figura 32 mostra a capacidade de regeneração do imunossensor em forma de histograma.

Figura 32: Histograma relacionando os valores de corrente de pico em função do número de regenerações do imunossensor.



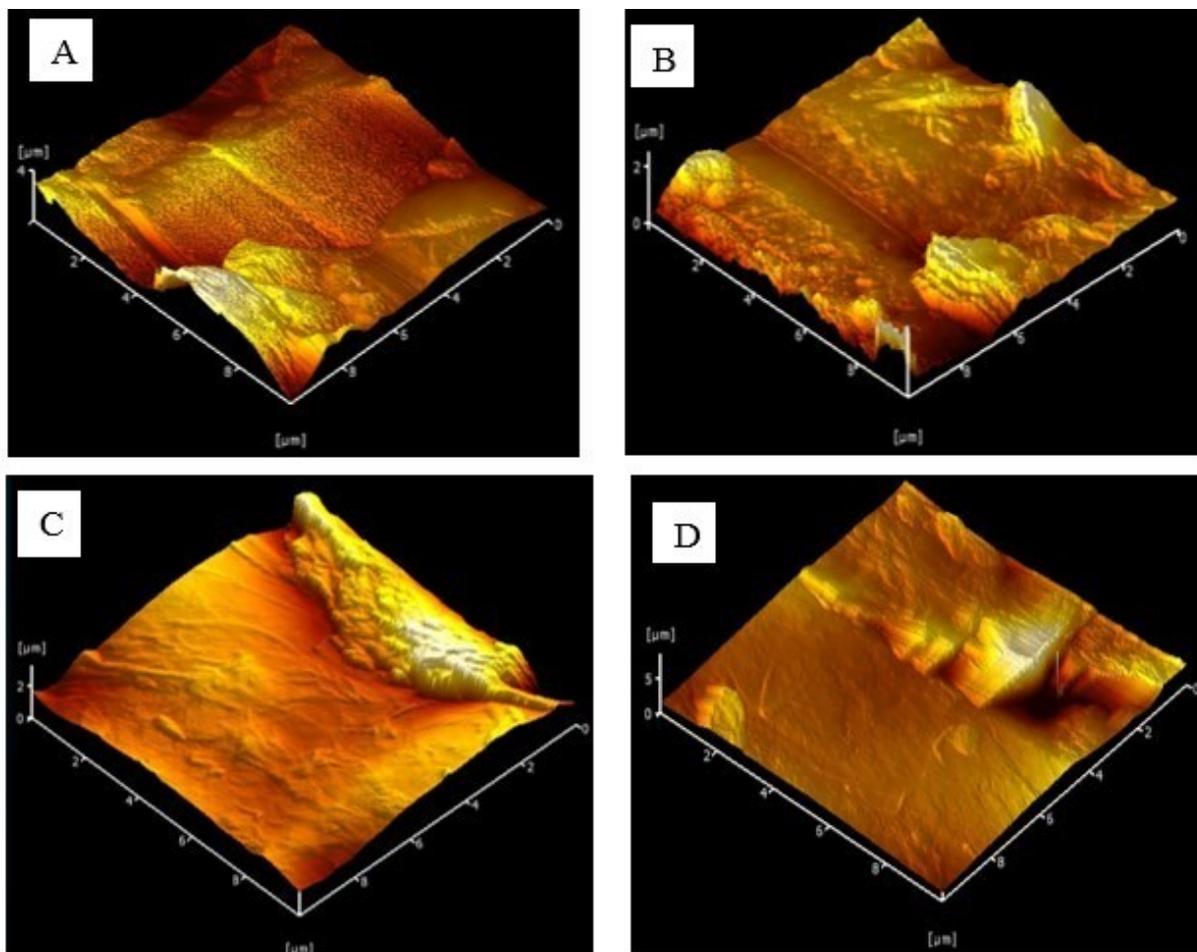
Fonte: A autora.

Com a análise da Figura 32 percebe-se que os eletrodos regenerados mantiveram a resposta até a segunda detecção consecutiva, sem alterações significativas nos valores de corrente de pico, sendo de 5% a variação de resposta entre a regeneração 1 e a regeneração 2. Na regeneração 3, a resposta do imunossensor decresceu 100%, sendo observado uma resposta de corrente igual a zero.

4.3.8 Análises da topografia da superfície do imunossensor

Realizaram-se análises morfológicas utilizando microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o EG/OGr/PTir/anti-TnIc (A), EG/OGr/PTir/anti TnIc/BSA (B), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro não enriquecido com TnIc (C), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro enriquecido com TnIc (D), indicado na Figura 33.

Figura 33: Imagens da topografia da superfície por AFM para EG/OGr/PTir/anti-TnIc (A), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA (B), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro não enriquecido com TnIc (C), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro enriquecido com TnIc (D).



Fonte: A autora.

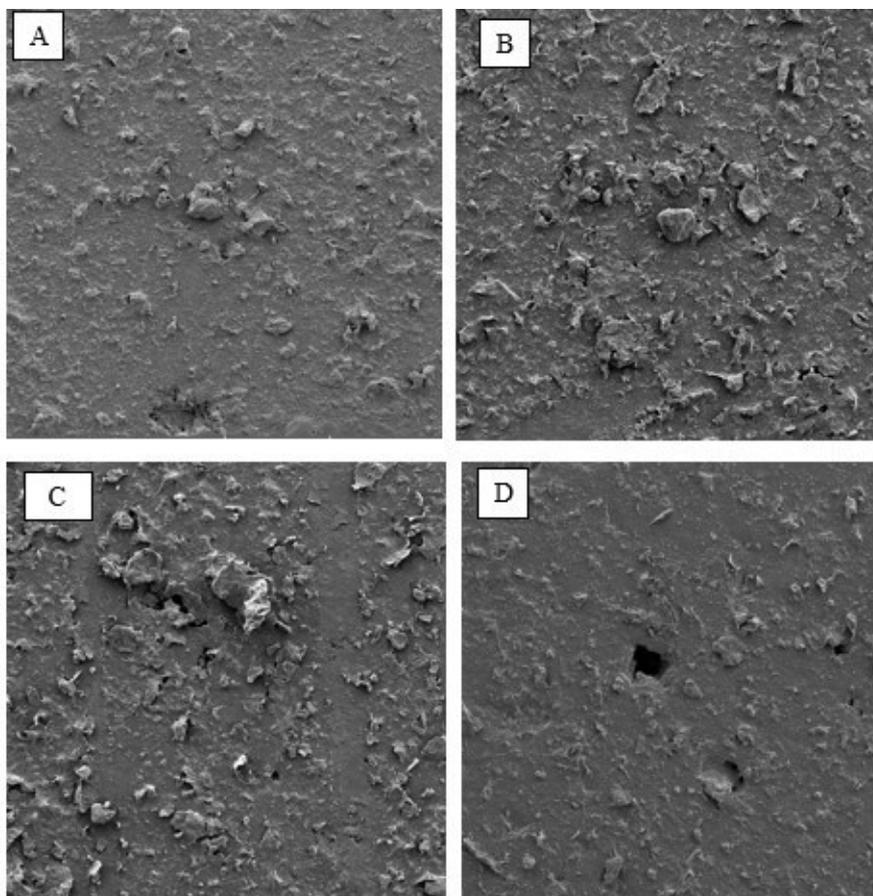
Observa-se em B que a presença da proteína BSA sobre a superfície do EG, indicada pelos grânulos dispostos, causa diminuição dos valores de rugosidade, sugerindo que as moléculas de BSA ocupem possíveis espaços vazios entre o nanocompósito e os anticorpos imobilizados. Comparando-se C e D, observa-se também a diminuição da rugosidade, sugerindo que a formação do imunocomplexo conferiu caráter mais uniforme a superfície devido ao elevado peso molecular dessas espécies. A Tabela 2 lista os valores de rugosidade citados.

Tabela 2: Valores de rugosidade dos eletrodos, sendo adsorção da sonda (A), bloqueio da superfície com BSA (B), incubação com alvo negativo (C) e incubação com alvo positivo (D). Em Sa: média aritmética da rugosidade, Sz/máx: altura máxima da rugosidade e Sq/RMS: raiz quadrada média da rugosidade.

	A	B	C	D
Sa (nm)	4,96	1,55	2,78	1,51
Sz/máx (nm)	4,10	2,53	3,31	1,82
Sq/RMS (nm)	6,44	2,12	3,72	2,02

As imagens da morfologia da superfície obtidas por MEV (Figura 34) corroboram os resultados obtidos na análise de AFM (Figura 33) observando-se na imagem (B) a presença de grânulos atribuídos ao BSA e na imagem (D) uma superfície homogênea, indicando que a formação do imunocomplexo uniformiza o eletrodo.

Figura 34: Imagens de MEV para EG/OGr/PTir/anti-TnIc (A), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA (B), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro não enriquecido com TnIc (C), EG/OGr/PTir/anti-TnIc/BSA/Soro enriquecido com TnIc (D). Ampliação 500.000 vezes.



5 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho conclui-se que foi possível realizar a redução do óxido de grafeno sobre a superfície do eletrodo de grafite e eletropolimerizar o monômero tiramina sobre a superfície do eletrodo de grafite, formando assim eletrodos modificados com o nanocompósito OGr/PTir.

Sobre a superfície destes eletrodos modificados com o nanocompósito OGr/PTir foi possível imobilizar o anticorpo anti troponina I como molécula de bioreconhecimento, bloquear esta superfície com uma solução de BSA e incubar esta superfície com soro de paciente saudável enriquecido com o antígeno troponina I (alvo).

A caracterização morfológica por AFM e MEV mostrou a modificação da superfície do eletrodo com as etapas de construção do imunossensor, havendo uma diminuição dos valores de rugosidade com a aplicação da solução de BSA e formação do imunocomplexo, indicando uma superfície mais uniforme e homogênea.

A curva de calibração obtida usando soro enriquecido com TnIc indicou um limite de detecção baixo (0,2 ng/mL), resultado promissor levando em consideração a complexidade da amostra utilizada.

O imunossensor demonstrou boa performance frente a sua capacidade de regeneração, necessita de pequeno volume de amostra de soro humano e boa estabilidade, visto que manteve 100% de sua resposta de corrente em até 30 dias de sua fabricação,

O imunossensor foi capaz de diferenciar amostras de soro de pacientes saudáveis (não acometidos por IAM) e doentes (acometidos por IAM), mostrando assim sua viabilidade como metodologia analítica.

REFERÊNCIAS

- [1] - BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações sobre saúde: mortalidade. 2014a. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 24 fevereiro, 2019.
- [2] - AVEZUM, Á.; PIEGAS, L.S.; PEREIRA, J.C.R. Fatores de risco associados com infarto agudo do miocárdio na região metropolitana de São Paulo. Uma região desenvolvida em um país em desenvolvimento. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 84, n. 3, p. 206-13, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2005000300003>
- [3]- CARDOSO, M.R., SILVA, D.G.S., RIBEIRO, E.A., NETO, A. M. R., Correlation Between the Complexity of Coronary Lesions and High-Sensitivity Troponin Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome, **International Journal of Cardiovascular Sciences**; v.31, n.3, p.218-225, 2018. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180014>
- [4] - ANDERSON, J.L *et.al.*, American college of cardiology; American heart association task force on practice guidelines, committee to revise the 2002 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v.50, p.1-157, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.11.003>
- [5] - JARROS, I.C.; JUNIOR, G.Z. Avaliação de risco cardíaco e o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio no Laboratório de análises clínicas. **Revista UNINGÁ**, v.19, n.3, 2018.
- [6] – KRISTIAN T., *et al.*, Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018), **Journal of the American college of cardiology**, The European Society of Cardiology, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association Inc and The World Hearth Federation, 2018.
- [7]- CARDOSO, M.R., SILVA, D.G.S., RIBEIRO, E.A., NETO, A. M. R., Correlation Between the Complexity of Coronary Lesions and High-Sensitivity Troponin Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome, **International Journal of Cardiovascular Sciences**; v.31, n.3, p.218-225, 2018. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180014>

- [8]-EGGERS, K.M., JERNBERG, T., LINDAH, B., Cardiac Troponin Elevation in Patients Without a Specific Diagnosis, **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, p. 1-9, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.082>
- [9] - RIBEIRO. J.A., PEREIRA, C.M., SILVA A.F., SALES, M.G.F., Electrochemical detection of cardiac biomarker myoglobin using polyphenol as imprinted polymer receptor, **Analytica Chimica Acta**, v. 981, p.41-52, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.017>
- [10]- NEUMANN, J.T., RUBSAMEN, N., SORENSEN, N.A., OJEDA, F., SCHOCK, A., SEDDIGHIZADEH, T. Z., WESTERMANN, D., BLANKENBERG, S., Evaluation of a new ultra-sensitivity troponin I assay in patients with suspected myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**; v.283, p. 35-40, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.12.001>
- [11]-BASSAN R.P., LEÃES P.E., TIMERMAN A.I., Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**; v.79, p.1-22, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2002001700001>
- [12] - NIENHUIS, M. B. *et al.*, Prognostic value of troponin after elective percutaneous coronary intervention: A meta-analysis. **Catheterization and Cardiovascular Interventions**; v.71, n.3, p.318–324, 2008.
<https://doi.org/10.1002/ccd.21345>
- [13]- LEWANDROWSKI K, CHEAN A, JANUZZI J., Cardiac Markers for Myocardial Infarction A Brief Review. **American Journal of Clinical Pathology Patterns Reviews**. v.118, 2002.
<https://doi.org/10.1309/3EK7-YVV9-228C-E1XT>
- [14] – Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprot/P19429#ptm_processing>. Acesso em 08-06-2019.
- [15]- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the Gold Book).
- [16]- WALIA, A., WAADT, R., JONES, A.M., Genetically Encoded Biosensors in Plants: Pathways to Discovery, **Annual Review of Plant Biology**, v.69, p. 497-524, 2018.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040104>
- [17]- MADURAIVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological

and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p. 113-129, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>

[18] - MAHATO, K. *et al.* Shifting paradigm of cancer diagnoses in clinically relevant samples based on miniaturized electrochemical nanobiosensors and microfluidic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 411–428, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.003>

[19]- SILVA, N.F.D., MAGALHÃES, J.M.C.S., MATOS, C.D., Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment, **Biosensors and Bioelectronics**, v.99, p.667-682, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.019>

[20] - RUBAB, M., SHAHBAZ, H.M., OLAIMAT A.N., OH, D.H., Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p.49-57, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.023>

[21] - SASAO, A., TAKAKI, M., JEONG H., YONEMITSU, K., OHTSU Y., TSUTSUMI H., FURUKAWA, S., MORIOKA, H., UEDA, H., NISHITANI, Y., Development of a fluvoxamine detection system using a Quenchbody, a novel fluorescent biosensor, **Drug Testing and Analysis**, v 11,p. 601-609, 2019. <https://doi.org/10.1002/dta.2520>

[23] - PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedical**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>

[24] - LOPES, P. D. Interação Ag-Ac - Testes sorológicos primário e secundário. Jaboticabal, 2016. 54 slides, color. Acompanha texto. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula-8-interacao-ag-ac-testes-sorologicos-primarios-e-secundarios.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

[25]- ZHANG, J.; ZHAO, J. Chapter 5 - Immuno-Biosensor. In: LI, G. **Nano Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications**, Elsevier, 2019.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815053-5.00005-2>

[26] - Frenzel A., Hust M. e Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, 2013.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00217>

[27] -GOUD, K.Y. *et al.* A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearalenone using screen-printed disposable electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 832, p. 336-342, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.10.058>

[28] – SVANCARA I, *et al.*, **Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes**, 1ª edição, CRC Press, 2011.

<https://doi.org/10.1201/b11478>

[29]- WANG, J., **Analytical Electrochemistry**, 3ª edição, Wiley-VCH, 2006.

[30]-GOSSER, D.K. Jr., **Cíclic Voltammetry- Simulation and analysis of reaction mechanisms**, 1ª edição, 1993.

[31] – BAGOTSKY V.S., **Fundamentals of electrochemical**, 2ª edição, John Wiley and Sons, Inc., 2005.

<https://doi.org/10.1002/047174199X>

[32]- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**, John Wiley and Sons, Inc., v.2, 2001.

[33]- HEINZE, J. Electrochemistry of conducting polymers. **Synthetic Metals**, v. 43, n. 1–2, p. 2805–2823, 1991.

[https://doi.org/10.1016/0379-6779\(91\)91183-B](https://doi.org/10.1016/0379-6779(91)91183-B)

[34] - XIA,L., WEI Z., WAN M., Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 341, p.1-11, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.029>

[35]- MARINHO, J. R. D. **Macromoléculas e polímeros**. 1. ed. Barueri: Manole, 2005.

[36]- SANTANA, A. T. de. **Polímeros Condutores: estudos e utilização de polímeros condutores**. 2012. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação de Tecnologia em Polímeros) - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro.

[37]- KHUDAISH, E. A. *et al.* Electrochemical oxidation of chlorpheniramine at polytyramine film doped with ruthenium (II) complex: Measurement, kinetic and thermodynamic studies. **Electrochimica Acta**, v. 135, p. 319–326, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.029>

[38]- CASTRO, C. M. *et al.*; Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **Journal of Materials Science**. v.43, p. 475-482, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

- [39] ABRAHÃO, O. *et al.* Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1037, p. 200–208, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.12.056>
- [40] SILVA, H.S. **Desenvolvimento de imunossensor para detecção do hormônio tireoideano L-triiodotironina (L-T3)**. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2017.
- [41] - YANG, C.; DENNO, M. E.; PYAKUREL, P.; VENTON, B. J. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review. **Analytica Chimica Acta**, n. 887, p.17-37, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.049>
- [42] - KUMAR, S.; AHLAWAT, W.; KUMAR, R.; DILBAGHI, N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 70, p. 498-503, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.062>
- [43]-BROWNSON, D. A. C.; SMITH, G. C.; BANKS, C. E. Graphene oxide electrochemistry: the electrochemistry of graphene oxide modified electrodes reveals coverage dependent beneficial electrocatalysis. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, p. 1-15, 2017.
<https://doi.org/10.1098/rsos.171128>
- [44]- ALLEN, M.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Chemical Reviews, n. 110, p. 132-145, 2010.
<https://doi.org/10.1021/cr900070d>
- [45] - PUMERA, M. Graphene in biosensing. **Materials Today**. V. 14, N. 7-8, p. 308-315, 2011.
[https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70160-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70160-2)
- [46] - CHUA, C. K.; PUMERA, M. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. **Chemical Society Reviews**, n. 43, p. 291-312, 2014.
<https://doi.org/10.1039/C3CS60303B>
- [47]- RODOVALHO, V. R. **Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN**, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia, Uberlândia, 64 fls, 2014.
- [48]- MOÇO, Anna Clara Rios. **Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica usando nanopartículas de ouro e prata**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

[49]- SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. **Metodologia de preparação do compósito polimérico formado por óxido de grafeno reduzido e poli (ácido 3-hidroxifenilacético), como matriz para hibridização de oligonucleotídeo.** Patente: Privilégio de Inovação. BR102015028052. 06 nov. 2015, data da publicação do pedido de privilégio. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

[50] - SEGATTO, M.S. **Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

[51]- DUTRA, R.F., KUBOTA, L.T., An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip, **Clinica Chimica Acta**, v. 376, p. 114-120, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.029>

[52] – CAI Y., KANG K., LI Q., WANG Y., HE W., Rapid and Sensitive Detection of Cardiac Troponin I for Point-of-Care Tests Based on Red Fluorescent Microspheres. **Molecules**, v 23, 2018.

<https://doi.org/10.3390/molecules23051102>

[53] A. Periyakaruppan, R. P. Gandhiraman, M. Meyyappan, J. E. Koehne, Label-Free Detection of Cardiac Troponin-I Using Carbon Nanofiber Based Nanoelectrode Arrays **Anal. Chem.**, n 85, p. 3858-3863, 2013.

<https://doi.org/10.1021/ac302801z>

[54] SUN X., MA Z., Highly stable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 470-472, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.061>

[55] – LIU G., QI, M., ZHANG Y., CAO C., GOLDYS E.M., Nanocomposites of gold nanoparticles and graphene oxide towards an stable label-free electrochemical immunosensor for detection of cardiac marker troponin-I. **Analytica Chimica Acta**, v. 909, n.25, p.1-8, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.023>

[56] -WALKER, J.M.; GINGOLD, E.B.; Molecular biology and biotechnology; Cambridge; The Royal Society of Chemistry, 1993.