



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

MODIFICAÇÕES DE ELETRODOS COM NANOMATERIAIS PARA DETECÇÃO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO

Aluna: Ana Flávia Oliveira Notário

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

**UBERLÂNDIA - MG
2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

MODIFICAÇÕES DE ELETRODOS COM NANOMATERIAIS PARA DETECÇÃO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO

Aluna: Ana Flávia Oliveira Notário

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Bioquímica (Área
Genética)**

**UBERLÂNDIA - MG
2020**

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

N899 2020	Notário, Ana Flávia Oliveira, 1991- MODIFICAÇÕES DE ELETRODOS COM NANOMATERIAIS PARA DETECÇÃO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO [recurso eletrônico] / Ana Flávia Oliveira Notário. - 2020. Orientador: Luiz Ricardo Goulart. Coorientador: Mauricio Foschini. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.550 Inclui bibliografia. 1. Genética. I. Goulart, Luiz Ricardo, 1962-, (Orient.). II. Foschini, Mauricio, 1977-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título. CDU: 575
--------------	--

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
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Vinte e quatro de julho de dois mil e vinte	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:05h
Matrícula do Discente:	11623GBI005				
Nome do Discente:	Ana Flávia Oliveira Notário				
Título do Trabalho:	Modificações de eletrodos com nanomateriais para detecções bioquímicas e imunológicas em biossensores eletroquímicos.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INTC em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT – TeraNano).				

Aos vinte e quatro dias do mês de julho de dois mil e vinte, às 14:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Google Meet*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano, Prof. Dr. Cleumar da Silva Moreira, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Prof. Dr. João Lucas O' Connel e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2020, às 18:08, 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 **Cleumar da Silva Moreira, Usuário Externo**, em 24/07/2020, às 18:12, 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 **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2020, às 18:13, 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 **Lúcio Roberto Cançado Castellano, Usuário Externo**, em 24/07/2020, às 18:14, 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 **João Lucas O'connell, Membro de Comissão**, em 24/07/2020, às 18:53, 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 **2107014** e o código CRC **169DF944**.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Newton, Lígia, Fabiana e Mateus.
Pai, Mãe, Bi e Mitso, se continuo seguindo em frente é porque
sei que tenho para onde voltar.*

AGRADECIMENTOS

Começo a escrever meus agradecimentos com um pedido de desculpas aos leitores por possivelmente me prolongar, mas justifico que jamais chegaria até aqui se não fossem todos que estiveram em meu caminho.

Agradeço...

A Deus e Nossa Senhora, pois nem nos meus melhores pedidos eu teria traçado um caminho tão maravilhoso, com tantas conquistas, aprendizado e autoconhecimento.

Ao meu orientador, Professor Luiz Ricardo Goulart, por toda a confiança que depositou em mim ao longo desses anos, por me permitir crescer e tanto me ensinar.

Às técnicas do laboratório de Nanobiotecnologia: Lu, Natássia e Valéria, por todo o suporte e ajuda que nos dão para trabalharmos da melhor maneira possível. Lu e Natássia, obrigada pelo cuidado e atenção.

Aos professores Cleumar, Eliton e Maurício, do IFPB, UFPB e UFU, respectivamente, pela colaboração e participação no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de nanobiotecnologia pela convivência, almoços descontraídos e ajuda diária.

Às amigas Julia e Aline, que me acolheram e foram minhas primeiras companhias no laboratório.

À Emily, Fábio e Lucca, com quem pude aprender e ensinar ao orientar em seus projetos.

À Fabi pela ajuda, amizade e companheirismo em todo o doutorado. E, juntamente com Arlene, Bel e Iara, pelo apoio e trabalho em equipe nessa reta final.

Aos doutorandos Kaline e Pedro, colegas e amigos, pela parceria, amizade e ensinamentos.

Ao amigo virtual Othon Campos, hoje professor na UFES, quem muito me ensinou sobre eletroquímica.

Aos colegas e amigos da 19ª turma de Engenharia Biomédica da UFU, em especial: Barbara, Bruna, Thaynara, Danillo, Mirella, Luan, Lucas, Lucca e Luísa, por me salvarem nos trabalhos em grupo, nas listas de chamada e com as matérias das provas. Aos colegas de estágio... quantos estagiários são necessários para se consertar um monitor multiparamétrico?

À Bioengenharia do HC-UFU, em especial aos técnicos do laboratório de eletrônica André, Cairo, Douglas, Renato, Victor e Wadson, que muito mais do que eletrônica, me ensinaram sobre acolhida, humildade e coleguismo.

Aos mestres Ana Cláudia, Selma e Marcos pela orientação, zelo e compromisso durante o momento mais difícil da nossa história recente.

Aos velhos amigos de infância, Digo, Nira e Belle, com quem aprendi que amizade sobrevive ao tempo e à distância.

Aos amigos da 3ª turma de Biomedicina...como é bom poder contar com vocês.

Às amigas do laboratório de tripanosomatídeos, Adelaide, Brunessa, Flávia, Rosi e Paula. É bom saber que o trabalho no passado nos fez amigas. Paula, obrigada por sempre me socorrer.

Ao meu orientador de Iniciação Científica e Mestrado, Professor Cláudio Vieira da Silva, por me ensinar a ser cientista e ter me dado minha primeira oportunidade na ciência.

Aos colegas e professores do *Moove dancing* e *CrossTraining*, por me fazerem, pela primeira vez na vida, renovar um contrato anual em uma academia. Vocês mantiveram minha mente sã durante esse período.

Aos amigos da comunidade Nossa Senhora do Rosário. Renovei minha fé a cada dia com a ajuda de vocês.

Aos meus pais, pois sei que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu e minha irmã pudéssemos estudar.

Ao meu marido, Mateus, sei que não foi fácil caminhar ao meu lado nos últimos tempos, mas obrigada por ser meu maior incentivador.

À minha irmã, Fabiana, pela companhia.

A Margot e Dudu, oito patinhas que me fizeram companhia nas horas de estudos.

Agradeço aos meus familiares, tias, primos e avó. Sei que torcem por mim sempre.

Aos meus sogros, Gilson e Marina, pelo entusiasmo ao me ver trilhando esse caminho. Aos cunhados, Estêvão e Mariana, obrigada pela acolhida.

Agradeço também aos órgãos de fomento que permitiram a realização dessa pesquisa: CAPES e CNPq.

Por fim, agradeço aos cidadãos brasileiros e reconheço o privilégio que tenho em estar prestes a conseguir 4 diplomas em um país onde pouco mais de 15% da população tem ensino superior. Espero fazer *jus*!

*“How do you want to be remembered?
As a sinner or a saint, as a hero or a villain?
Think about the steps you take
How do you want to be remembered?
When they're standing at your grave?
On your tombstone, what is written?
Think about the steps you take”*

MAGIC! – How do you want to be remembered?

RESUMO

Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é uma doença cardiovascular e está entre as principais causas de mortes no mundo. Pacientes que são atendidos em pronto-atendimentos com suspeita de IAM passam por exames de atividade elétrica cardíaca e busca por biomarcadores de lesão cardíaca, geralmente troponinas e creatina-quinase. A detecção desses biomarcadores pode ser feita utilizando biossensores, são dispositivos analíticos capazes de converter uma resposta biológica em um sinal de outra natureza. O objetivo desse trabalho foi construir um biossensor eletroquímico utilizando matrizes poliméricas enriquecidas com nanomateriais, tendo como alvo marcadores biológicos para IAM. Para isso matrizes foram colocadas em contato com a superfície dos eletrodos e a funcionalização por meio da deposição do polímero foi induzida através da passagem de corrente. Posteriormente a modificação foi validada a partir de leituras de voltametria cíclica. Através de microscopia eletrônica de varredura foi constatado que não houve alteração na superfície microscópica dos eletrodos tratados. Entretanto, a modificação foi capaz de melhorar o sinal de leitura, aumentando a área ativa, a densidade de corrente e homogeneizando as leituras entre os eletrodos. Duas estratégias de reconhecimento de analito foram propostas, uma chamada de sanduíche, utilizando dois anticorpos para reconhecimento das moléculas e a outra chamada de direta. No caso da detecção direta a amostra foi colocada diretamente sobre a superfície do eletrodo modificado. As duas estratégias foram capazes de diferenciar amostras positivas de negativas. A utilização dessa metodologia traz vantagens pelo fato de as matrizes poliméricas serem de fácil obtenção e o processo de modificação simplificado, além de poderem ser enriquecidas com diversos materiais. Garantir que a etapa de funcionalização do eletrodo seja eficiente é essencial para a construção de um biossensor, pois garante também que a deposição das moléculas de captura se dê de maneira semelhante a cada repetição. A possibilidade de se ter um biossensor que não utilize marcadores ou reagentes é uma vantagem quando se fala em praticidade e baixo custo. Por fim, nanomateriais associados a estruturas poliméricas foi uma maneira eficiente de estabilizar e modificar a superfície de eletrodos *screen-printed* e a plataforma aqui desenvolvida pode ser aprimorada para se tornar uma ferramenta clínica para diagnóstico de IAM.

Palavras-chave: Infarto agudo do miocárdio; Marcadores cardíacos; Matriz polimérica, Modificação superfície de eletrodo;

ABSTRACT

Acute Myocardial Infarction (AMI) is a cardiovascular disease and is among the leading causes of death worldwide. Patients who are seen in emergency rooms with suspected AMI undergo examinations of cardiac electrical activity and search for biomarkers of cardiac injury, usually troponins and creatine kinase. The detection of these biomarkers can be done using biosensors, they are analytical devices capable of converting a biological response into a signal of another nature. The objective of this work was to build an electrochemical biosensor using polymeric matrices enriched with nanomaterials, targeting biological markers for AMI. For this, matrices were placed in contact with the surface of the electrodes and functionalization through polymer deposition was induced through the passage of current. Subsequently, the modification was validated based on cyclic voltammetry readings. Through scanning electron microscopy, it was found that there was no change in the microscopic surface of the treated electrodes. However, the modification was able to improve the reading signal, increasing the active area, the current density and homogenizing the readings between the electrodes. Two analyte recognition strategies have been proposed, one called sandwich, using two antibodies to recognize molecules and the other called direct. In the case of direct detection, the sample was placed directly on the surface of the modified electrode. The two strategies were able to differentiate positive from negative samples. The use of this methodology has advantages because the polymeric matrices are easy to obtain and the modification process simplified, in addition to being enriched with different materials. Ensuring that the electrode functionalization step is efficient is essential for the construction of a biosensor, as it also ensures that the deposition of the capture molecules takes place in a similar way with each repetition. The possibility of having a biosensor that does not use markers or reagents is an advantage when it comes to practicality and low cost. Finally, nanomaterials associated with polymeric structures were an efficient way to stabilize and modify the surface of screen-printed electrodes and the platform developed here can be improved to become a clinical tool for the diagnosis of AMI

Keywords: Cardiac biomarkers; Heart failure; Electrode surface's enhanced; Polimeric matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da creatinoquinase (CK)	17
Figura 2. Estrutura química da troponina I (TnIc)	18
Figura 3. Esquema da estrutura de um biossensor	20
Figura 4. Organização dos elementos para produção da matriz polimérica	27
Figura 5. Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	34
Figura 6. Análise termogravimétrica das matrizes.	36
Figura 7. Caracterização espectroscópica por infravermelho	37
Figura 8. Voltamogramas de eletrodos virgens e modificados	38
Figura 9. Número de ciclos necessários para estabilizar o eletrodo	39
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das matrizes	40
Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho	41
Figura 12. Voltamogramas cíclicos de eletrodos virgens, modificados e com anticorpo adsorvido	42
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho modificado com nanocristais	44
Figura 14. Estratégias para estabilização e a área ativa correspondente	45
Figura 15. Voltamogramas cíclicos para cada uma das modificações utilizadas	47
Figura 16. Comparação entre o voltamograma cíclico das modificações no eletrodo	48
Figura 17. Imagem da membrana do ensaio Dot-blot	49
Figura 18. Análise de ATR-FTIR da conjugação dos anticorpos com a bead magnética	50
Figura 19. Esquema ilustrativo do teste sanduíche	51
Figura 20. Voltamograma cíclico para o teste sanduíche	52
Figura 21. Gráficos da leitura das amostras de soro negativo e do calibrador	54
Figura 22. Diminuição da área ativa em eletrodo com soro negativo	55
Figura 23 construção da curva de calibração para obtenção do intervalo de detecção para Tnc.	56

Figura 24 Construção da curva de calibração para obtenção do intervalo de detecção de CK-MB.....	57
Figura 25 Diferenciação entre amostras positivas e negativas para IAM adotando parâmetros para dois marcadores diferentes.....	58
Figura 26. Progressão dos níveis de Tnc	59
Figura 27. Diferenciação por grau de lesão cardíaca	61
Figura 28. Ilustração de resumo dos dados apresentados e de perspectivas futuras	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das matrizes poliméricas.....	27
Tabela 2. Identificação das biomoléculas que foram usadas nesse trabalho	30
Tabela 3. Propriedades térmicas de matrizes enriquecidas a partir de curvas DSC. A amostra controle é a matriz contendo apenas PLA e PEG	35
Tabela 4. Parâmetros TG e DTG das matrizes. A amostra controle é a matriz contendo apenas PLA e PEG.	36
Tabela 5. Fator de Rugosidade calculado a partir da área obtida após cada modificação em relação à área geométrica do eletrodo de trabalho.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
Ag/ AgCl	Prata/Cloreto de prata
ATR	Reflectância Total Atenuada
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
cm	Centímetros
CK	Creatinoquinase
CK-MB	Creatinoquinase porção MB
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DVC	Doença cardiovascular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico no português
EAS	Estabelecimento de Atenção à Saúde
ECG	Eletrocardiograma
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de
Fourier	
h	Hora
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
kV	Quilovolt
LDH	Lactato desidrogenase
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
ng	Nanograma
NBT	<i>p-nitroblue tetrazolium chloride</i>

NTC	Nanotubos de Carbono
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampão fosfato salino no português
PCr	Fosfocreatina
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poliácido láctico
pg	Picograma
POC	<i>Point-of-care</i>
R6G	Rodamina 6G
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico no português
s	Segundo
SBS	<i>Solution Blow Spinning</i>
SCA	Síndrome Coronária Aguda
TA	Temperatura ambiente
Tg	Temperatura de transição vítrea
TG	Termogravimetria
Tnc	Troponina cardíaca
TnIc	Troponina cardíaca I
TnTc	Troponina cardíaca T
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organização Mundial da Saúde no português
ZnO	Óxido de Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
A	Ampere
Au	Ouro
I	Corrente
j	Densidade de corrente
cm ⁻²	Área (centímetros quadrados)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Infarto Agudo do Miocárdio	15
1.1.1. Marcadores de Lesão Tecidual Cardíaca	16
1.2. Biossensores	19
1.2.1. Considerações Gerais	19
1.2.2. Biossensor Eletroquímico	21
1.2.3. Modificação do eletrodo	23
2. OBJETIVO GERAL	25
2.1. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Produção e caracterização das matrizes poliméricas	26
3.1.1. Obtenção das matrizes poliméricas	26
3.1.1. Termogravimetria (TGA)	28
3.1.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	28
3.2. Modificação dos eletrodos utilizando as matrizes poliméricas	28
3.3. Validação da modificação do eletrodo	28
3.3.1. Eficiência da superfície modificada	28
3.3.2. Cálculo da área ativa	29
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
3.5. Montagem do biossensor	30
3.5.1. <i>Dot-Blot</i> para validação dos anticorpos	31
3.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	32
3.5.3. Teste sanduíche	32
3.5.4. Detecção direta	33
3.6. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Caracterização das matrizes poliméricas	34
4.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	34
4.1.2. Análise termogravimétrica (TG)	35
4.1.3. Caracterização espectroscópica por infravermelho	37
4.2. Processo de modificação dos eletrodos utilizando matrizes poliméricas	38
4.2.1. Estabilização da superfície de trabalho	38
4.2.2. Eficiência de modificação	41
4.2.3. Área ativa do eletrodo	45

4.3	Montagem do biossensor.....	49
4.3.1	Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante pelo Ac.....	49
4.3.2	Conjugação do Anticorpo à partícula magnética.....	50
4.3.3	Teste Sanduíche	51
4.3.4	Detecção direta	53
5.	CONCLUSÃO.....	64
6.	REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infarto Agudo do Miocárdio

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) Doenças cardiovasculares (DCV) são a primeira causa de morte no mundo, atingindo cerca de 17,9 milhões de pessoas a cada ano. DCVs são um grupo de desordens que atingem vasos sanguíneos e o coração, incluindo doenças coronarianas, cerebrovascular, dentre outras. A cada cinco mortes por DCV, quatro são devido a paradas cardíacas e acidente vascular encefálico (AVE) e um terço dessas mortes acontece em pessoas abaixo de 70 anos (WHO, 2020).

Dentre as DCV se destaca o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), uma Síndrome Coronária Aguda (SCA) caracterizada pela morte de cardiomiócitos. Geralmente provocada pelo desbalanço entre a demanda e a oferta de suprimento sanguíneo ao tecido cardíaco (perfusão), provocado pela obstrução de uma artéria coronariana, o que leva a um quadro de isquemia e posterior lesão tecidual (THYGESEN *et al.*, 2018).

Em casos de IAM típicos a obstrução é ocasionada por uma sequência de eventos que se iniciam com a mudança morfológica de uma placa aterosclerótica, desencadeando a formação de trombos e ativando fatores da cascata de coagulação. Na grande maioria dos casos, o IAM está associado com a pré-existência de doenças vasculares que levam à formação de placas ateroscleróticas. Casos mais escassos são causados por outras doenças circulatórias e/ cardíacas ou casos agudos que levam à formação de estruturas capaz de causar entupimento dos vasos (ROBBINS).

Um quadro de isquemia grave causa perda de contratilidade dentro de alguns segundos, e em resposta a essa perda, há insuficiência cardíaca. Antes mesmo de que haja morte celular com lesão tecidual. Quando esse quadro persiste por alguns minutos há de fato necrose com dano tecidual irreversível (ROBBINS).

Uma lesão irreversível em células cardíacas provoca rompimento da membrana celular e, conseqüentemente, extravasamento de conteúdo interno, incluindo proteínas. Algumas dessas proteínas podem ser usadas como marcadores para diagnosticar a extensão do dano celular. Após a lesão, a cinética dos marcadores depende de fatores como: compartimento intracelular das proteínas, tamanho das moléculas, fluxo regional linfático e sanguíneo, e taxa de depuração do marcador (APPLE, 1999; BIGNAMI *et al.*, 2009; CHACKO *et al.*, 2018).

A descoberta desses marcadores trouxe vantagens para a clínica na hora do diagnóstico, pois, os sintomas apresentados pelo paciente podem ser confundidos com um acometimento gastrointestinal ou desordens pulmonares, por ter apresentações clínicas atípicas (DRACUP *et al.*, 1995). Isso faz com que o paciente esteja suscetível ao agravamento do quadro clínico, correndo risco de vida. Anteriormente aos diagnósticos usando marcadores de lesão cardíaca, pacientes com dores torácicas agudas eram diagnosticados para IAM somente por meio do exame de eletrocardiograma (ECG) (THYGESEN *et al.*, 2018).

O eletrocardiograma é capaz de quantificar a atividade elétrica do músculo cardíaco. Atividade essa que apresenta intensidade diferente para cada uma das cavidades desse órgão. O que gera um gráfico característico e, como no IAM há perda de atividade celular, há, conseqüentemente, perda de atividade elétrica. Essa alteração pode ser observada em um exame de ECG (STRIDH *et al.*, 2001). Embora haja uma baixa sensibilidade, a eficácia dos testes depende em sua maior parte do profissional que o avalia, o ECG tem fundamental importância para o diagnóstico de IAM. E, a depender da situação, tem seu resultado associado a testes de marcadores cardíacos para um diagnóstico decisivo (SCHIFF *et al.*, 2003; UPASHAM *et al.*, 2018).

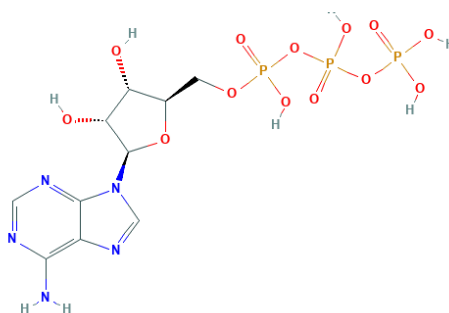
1.1.1. Marcadores de Lesão Tecidual Cardíaca

Um biomarcador de lesão tecidual cardíaca deve ter características como: I) sensibilidade suficiente para, em pequenas quantidades, indicar dano cardíaco; II) ser específico do tecido muscular cardíaco; III) informar a severidade da lesão e um prognóstico da doença; IV) mostrar a eficiência de um tratamento de reperfusão cardíaca; V) distinguir entre lesões reversíveis e irreversíveis; VI) não ser detectado em pacientes que não tenham dano cardíaco; VII) fácil de ser mensurado e estável em condições de armazenamento duradouras (AYDIN *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, algumas enzimas como alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) eram utilizadas como marcadores de lesão tecidual cardíaca. Estudos posteriores mostraram que essas enzimas não eram tão eficientes por apresentarem baixa especificidade. Rotineiramente, tem se utilizado as creatinoquinase, porção MB (CK-MB), mioglobina e troponinas cardíacas (Tnc) no diagnóstico. Esses biomarcadores tem importância também ao determinar a gravidade da lesão, fornecendo informações de prognóstico (APPLE, 1999; WEBER *et al.*, 2005; AYDIN *et al.*, 2019).

Creatinoquinase (CK), também conhecida como adenosina-5-trifosfato ou creatina fosfotransferase, dentre outros (figura 1), catalisa a transferência reversível de um grupo fosforil do ATP para a creatina, produzindo a fosfocreatina (PCr) e ADP (TEIXEIRA & BORGES, 2012).

Figura 1. Estrutura química da creatinoquinase (CK)



Fonte: PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5957#section=Structures>. Acesso em: 10 jun. 2020

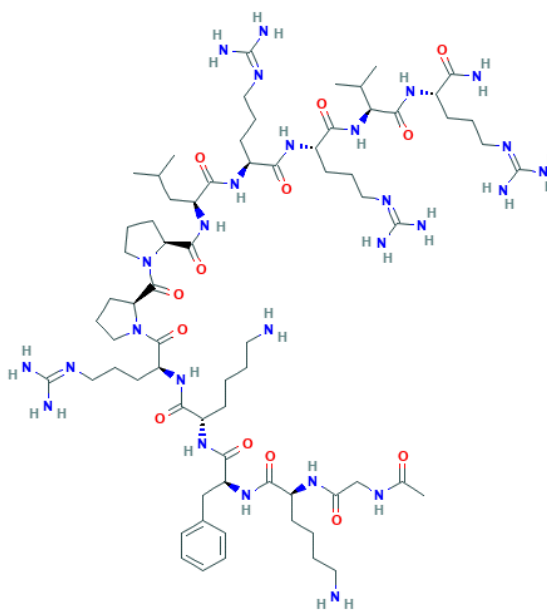
Existem quatro isoformas de CK que são nomeadas de acordo com o tecido em que são encontradas e isoladas histologicamente. Duas dessas isoformas são citosólicas e duas mitocondriais. As duas CK's tecido-específicas (músculo ou cérebro) são citosólicas e existem em homodímeros (CK-MM e CK-BB) em condições fisiológicas. Mais tarde foram identificadas a associação dessas porções (CK-MB), composta pelo monômero muscular (M) e cerebral (B). Essa organização em heterodímeros aparece frequentemente durante o desenvolvimento embrionário em tecido muscular esquelético, persistindo durante a vida adulta em tecido muscular cardíaco (APPLE, 1999; TEIXEIRA & BORGES, 2012).

Embora amplamente utilizada na prática clínica, o uso da CK-MB, tem algumas limitações, sendo a maior delas o fato de sua concentração sérica se elevar em casos de danos em tecido muscular não cardíaco. As subformas, CK-MB, são empregadas como marcadores precoces, menos de seis horas após a lesão. Como há uma dificuldade na especificidade, costumam ser empregadas associadas à detecção de outros marcadores (APPLE, 1999; LIM *et al.*, 2019).

Um segundo marcador de lesão tecidual cardíaco é a Troponina cardíaca (Tnc), proteína do complexo de regulação miofibrilar atuantes no processo de contração muscular. A Tnc é formada por três subunidades: troponina T (TnTc), troponina I (TnIc) (figura 2) e troponina C. Nenhuma das três subunidades é expressa em músculo liso, porém a troponina C é co-expressa em fibras musculares de contração lenta, e,

portanto, não é considerada um marcador específico. Comparadas aos marcadores mencionados anteriormente, as troponinas (TnTc e TnIc) possuem maior especificidade e sensibilidade para detecção de IAM (APPLE, 1999; WEBER *et al.*, 2005; BIGNAMI *et al.*, 2009; TWERENBOLD *et al.*, 2017).

Figura 2. Estrutura química da troponina I (TnIc)



Fonte: PubChem. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44152811#section=2D-Structure>. Acesso em: 10 jun. 2020

As troponinas são liberadas na corrente sanguínea e podem ser detectadas em um período de aproximadamente duas a oito horas após o IAM atingindo pico de concentração dentro de um a dois dias. E, podem permanecer detectáveis até cerca de cinco a dez dias depois (FATHIL *et al.*, 2015; MYTHILI & MALATHI, 2015).

Geralmente as troponinas estão dentro dos valores normais em até 20% de pacientes recém-admitidos em um Estabelecimento de Atenção à Saúde (EAS) e que mais tarde confirmam diagnóstico para IAM. Como a quantidade desse marcador na corrente sanguínea aumenta com o tempo após a lesão, a medida de maneira seriada, com acompanhamento de aumento ou diminuição dos níveis, é importante para um diagnóstico correto (HOELLER *et al.*, 2013).

A sensibilidade do teste vai determinar o limite de quantificação desse marcador. O limiar indicativo de lesão cardíaca é variável de acordo com a metodologia utilizada, porém, uma quantidade equivalente a 0,1 ng. mL⁻¹ de Tnc já é considerada suficiente para indicar um quadro de micro IAM enquanto cerca de 100

ng. mL^{-1} indica um dano em uma região grande de tecido (FATHIL *et al.*, 2015; UPASHAM *et al.*, 2018).

LIM *et al.* (2019) propôs um biossensor *multiplex*, isto é, capaz de detectar de maneira simultânea mais de um marcador cardíaco. Este sistema, também chamado de *point-of-care* (POC), é baseado em microfluídica associado a uma câmera de *smartphone* (detecção óptica) e foi capaz de chegar a um resultado quantitativo em menos de uma hora.

A demanda por diagnósticos sensíveis e rápidos aumentou o interesse pelo desenvolvimento de novos sensores para detecção de troponinas cardíacas. Há uma variedade de métodos utilizados, incluindo Imunoensaio Enzimático (ELISA), Imunoensaio de Quimiluminescência, detecção elétrica, ressonância plasmônica de superfície (SPR), dentre outros, utilizando diferentes sistemas de revelação dos testes (SANATI *et al.*, 2019)

Quando se compara biossensores baseados em detecção óptica com aqueles que utilizam detecção eletroquímica os primeiros possuem equipamentos mais robustos e exigem uma infraestrutura que frequentemente é mais cara. Isso explica o aumento no número de pesquisas que buscam o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos observado em publicações recentes (SANATI *et al.*, 2019).

O investimento no desenvolvimento de biossensores, independente de sua natureza, se justifica por características que esses dispositivos apresentam como: detecção rápida, alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e fácil miniaturização.

1.2. Biossensores

1.2.1. Considerações Gerais

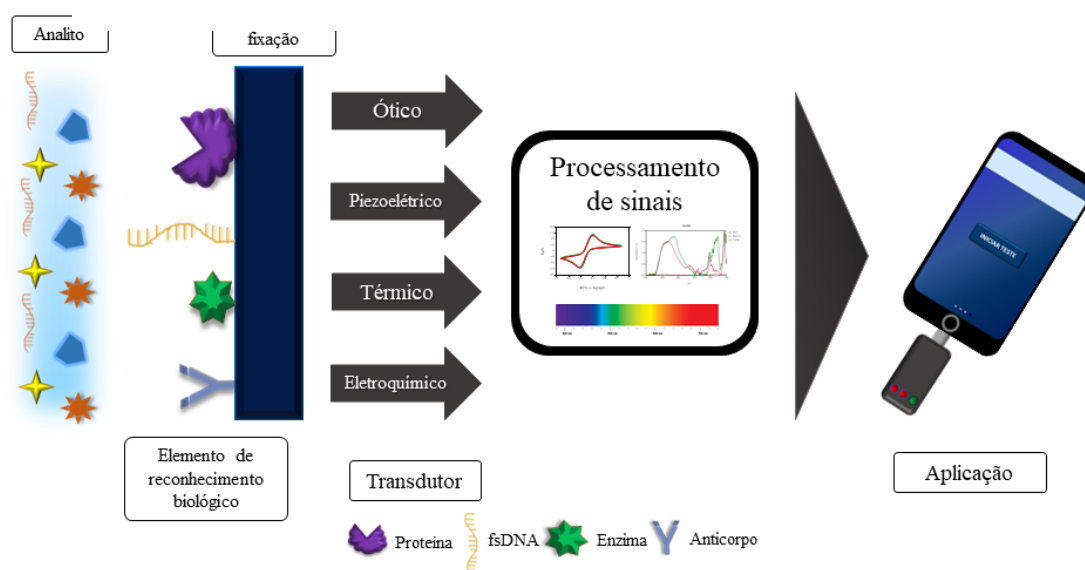
Há relatos de estudos envolvendo o uso de sensores desde meados do século passado e várias definições são dadas para essa tecnologia. HULANICKI *et al.* (1991) dividiu os sensores em dois grupos: sensores químicos, capazes de transformar um sinal químico em um outro sinal detectável; e sensores físicos, aqueles capazes de captar sinais físicos. De maneira um pouco mais detalhada, um sensor químico é capaz de transformar informações químicas - variando desde um componente específico até a composição total do sistema - em um sinal analiticamente útil. Já um sensor físico, é capaz de fornecer informações sobre propriedades físicas (mecânicas, térmicas etc) do sistema (DE MARCELLIS & FERRI, 2011).

Dentro do campo dos sensores, existem os biossensores, que são dispositivos analíticos capazes de converter um sinal biológico em uma resposta elétrica. O primeiro exemplo de biossensor, desenvolvido por Clark e Lyons em 1962, foi feito utilizando a enzima glicose-oxidase adsorvida em uma membrana de diálise sobre uma sonda de oxigênio. A adição da glicose determinava o decréscimo da concentração de oxigênio de maneira proporcional (CLARK & LYONS, 1962).

Em geral, os biossensores podem ser divididos em duas partes: uma camada de reconhecimento biológico (formada por bioreceptores de diferentes naturezas) e um transdutor de sinal, responsável por converter a resposta analítica ao dispositivo de interpretação (PALCHETTI & MASCINI, 2010). Essas duas partes estão interligadas e classificam esses dispositivos.

Os biossensores são categorizados por princípios básicos do transdutor e pelos elementos biológicos de reconhecimento. Pelo transdutor, os biossensores podem ser classificados como óticos, piezoelétricos, térmicos e eletroquímicos (figura 3). E, dentro do grupo de biossensores eletroquímicos, existem os potenciométricos (quantificam potencial ou acúmulo de carga na superfície), amperométricos (corrente mensurável) e condutimétricos (medem a variação na condutividade do meio) (THÉVENOT *et al.*, 2007).

Figura 3. Esquema da estrutura de um biossensor



Fonte: Elaborado pelo autor. O analito se refere à amostra a ser analisada, o elemento de reconhecimento biológico se trata da biomolécula utilizada. A matriz de fixação e o transdutor estão diretamente relacionados. O sinal adquirido pelo transdutor é processado e depois a aplicação está no biossensor já pronto.

Há um grupo de materiais biológicos que são geralmente utilizados para a produção de biossensores, dentre os quais: enzimas ou outros elementos biológicos baseados em enzimas, que representam uma classe de biossensores chamados de catalíticos; Lectinas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), anticorpos e ligantes sintéticos, que dão nome à classe de biossensores com reconhecimento por afinidade. Dentro dessa última subdivisão, para biossensores com reconhecimento por anticorpo, dá-se o nome de imunossensores. Esse entendimento é fundamental, pois, a escolha adequada da camada biológica, em conjunto com o transdutor a ser utilizado, está diretamente ligada à eficiência de reconhecimento do biossensor em desenvolvimento (PALCHETTI & MASCINI, 2010; MEHROTRA, 2016).

1.2.2 Biossensor Eletroquímico

Biossensores eletroquímicos têm como princípio fundamental o movimento de íons e difusão de espécies eletroativas. No caso de reconhecimentos por afinidade a detecção dessas espécies, consumidas ou geradas, é feita durante o processo de oxidação e redução de uma sonda eletroquímica utilizada (MEHRVAR & ABDI, 2004).⁴

O sistema, de maneira geral, é formado por: um eletrodo referência que normalmente é feito de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl); um eletrodo auxiliar; e um eletrodo de trabalho. O eletrodo de trabalho funciona como um elemento transdutor da reação, além de ser o local onde as moléculas de reconhecimento biológico são acopladas. O eletrodo de referência mantém o potencial de trabalho estável (GRIESHABER *et al.*, 2008).

Os eletrodos no sistema eletroquímico são conectados a um potenciostato e conectados entre si através de uma solução contendo uma espécie eletroativa de interesse com excesso de eletrólito suporte, inerte à reação. É esse eletrólito o responsável pelo controle difusional das espécies (GANDRA *et al.*, 2004).

No campo da eletroquímica existe uma técnica amperométrica chamada de voltaméria, fundamentada nos fenômenos que ocorrem na interface do eletrodo de trabalho. A interface é a região formada pela superfície desse eletrodo e uma camada fina de solução adjacente. Tal técnica é considerada dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de uma corrente elétrica, medida em função de um potencial controlado (aplicado entre o eletrodo de trabalho e o referência). Assim, nesse caso, a informação do analito é obtida em função da magnitude da corrente

elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, permitindo a construção de um sensor qualitativo e quantitativo (PACHECO *et al.*, 2013).

Imunossensor eletroquímico, um tipo de sensor com reconhecimento por afinidade, foi a plataforma escolhida para a realização deste trabalho. Esses dispositivos possuem aplicações desde industriais a ambientais, sendo também frequentemente utilizados em situações hospitalares, como monitoramento e diagnóstico. Possuem como base para construção a imobilização de anticorpos (elemento de reconhecimento biológico) em eletrodos quimicamente modificados (SOARES, 2011; KOYUN *et al.*, 2012).

Como já mencionado anteriormente, os elementos biológicos de reconhecimento são imobilizados na superfície do eletrodo de trabalho. Para essa imobilização existem alguns métodos mais frequentemente utilizados, dentre eles: adsorção, aprisionamento, ligações covalentes, cruzadas e por afinidade. No método de aprisionamento, geralmente são usados polímeros condutores para modificar a superfície do eletrodo de trabalho. Já as ligações covalentes são importantes pois evitam que o elemento biológico não seja liberado na solução (BANICA, 2012a).

Outro ponto que deve ser observado é que a reação acontece basicamente na interface entre eletrodo-solução. De maneira simplificada, a leitura obtida se baseia no fluxo ordenado de elétrons que surge das reações químicas que acontecem naquele ambiente. Induzidas por um potencial externo conhecido. Considerando esse fato, o processo de modificação da superfície do eletrodo e a forma como as moléculas são adsorvidas interferem diretamente na resposta a obtida (FERNANDES & KUBOTA, 2001).

A evolução de sensores enzimáticos, relacionados com esse tratamento de superfície, classifica-os em gerações: primeira, segunda e terceira. São agrupados de acordo com o processo envolvido na transferência de carga, reconhecimento do analito e processamento de sinal. Nos biossensores de primeira geração, o acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo é baseado na eletroatividade do substrato da enzima ou do produto formado na reação bioquímica. Nessa configuração é necessário utilizar altos potenciais, o que pode comprometer a eficiência do elemento de reconhecimento (GORTON *et al.*, 1999; CHAUBEY & MALHOTRA, 2001; FREIRE *et al.*, 2003).

Em biossensores chamados de segunda geração são utilizados mediadores, pequenas moléculas redox ativas, livres em solução ou imobilizados juntamente com

a biomolécula. Os mediadores atuam como compostos intermediários, realizando transporte de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo. Essa configuração implica na utilização de um potencial reduzido. Naqueles biossensores de terceira geração a transferência eletrônica entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo se dá de maneira direta. O desempenho desse tipo de biossensor está diretamente relacionado, portanto, com a metodologia de imobilização utilizada (GORTON *et al.*, 1999; CHAUBEY & MALHOTRA, 2001; FREIRE *et al.*, 2003).

1.2.3 Modificação do eletrodo

As modificações nas superfícies dos eletrodos têm como objetivo controlar a reatividade da interface para imobilização e transferência de carga, favorecendo a adesão do elemento de reconhecimento, e frequentemente têm sido associadas a um aumento da estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor e melhora na qualidade do sinal captado (CAI *et al.*, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de se utilizar polímeros sintéticos como matriz para imobilização de biomoléculas, os quais podem servir como intermediários na interação entre o elemento de reconhecimento e o eletrodo, além de auxiliar na transdução do sinal elétrico, melhorando o tempo de resposta, sensibilidade e limite de detecção de biossensores. Polímeros são compostos que possuem alta massa molar, formados pela repetição de muitas unidades químicas (monômeros) (TUNCAGIL *et al.*, 2011; ARREDONDO *et al.*, 2012; PAROLO & MERKOCI, 2013).

Materiais em escalas nanométricas também podem ser usados para configurar contato elétrico, melhorando a condutividade local e, conseqüentemente, o sinal a ser captado. São exemplos desses materiais: nanopartículas metálicas, funcionalizadas ou não; nanomateriais de carbono (principalmente os nanotubos de carbono – NTC), e nanofibras constituídas por polímeros (BANICA, 2012b).

FERREIRA (2017) demonstrou a possibilidade de se usar polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos associados em uma matriz formada por fibras micro e nanométricas como estrutura carreadora. A associação permitiu uma liberação mais eficiente, inclusive de compostos produzidos juntamente com a matriz. A possibilidade de controlar a cinética de liberação dessas estruturas permite que elas sejam usadas em diversas aplicações, como no tratamento da superfície de eletrodos para construção de sensores.

O aumento nas buscas por cada vez mais opções de biossensores, para as mais variadas aplicações, está nas características vantajosas desses dispositivos quando comparados a técnicas de diagnóstico existentes no mercado. Biossensores apresentam menor tempo de processamento de análise de amostra (de minutos a horas), possibilidade de integração, análise em tempo real e não exigem locais com estruturas físicas complexas (NAKAMURA & KARUBE, 2003).

Um exemplo da contribuição da evolução nos estudos com biossensores e sua aplicação na área médica são os sensores para detecção de glicose. Esses sensores vêm sendo aprimorados desde aquele criado por Clark em 1962. Desde a década de 70 até o ano 2000 algumas gerações de dispositivos foram criadas, baseadas em formas mais eficientes de reconhecimento do analito. Esses sensores auxiliam no diagnóstico e monitoramento de pacientes com diabetes (METKAR & GIRIGOSWAMI, 2019).

Além da detecção rápida, seletividade e sensibilidade fazem com que biossensores tenham aplicações clínicas em quadros onde o tempo de resposta é fundamental para a tomada de decisão. A possibilidade de miniaturização e custo reduzido garante mais acessibilidade a esse tipo de dispositivo, sendo uma ferramenta importante de auxílio ao diagnóstico. Podendo, portanto, ser uma alternativa na investigação de casos de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) (LEE *et al.*, 2015).

2. OBJETIVO GERAL

Construir um sensor eletroquímico utilizando estruturas nanométricas, tendo como alvo marcadores biológicos para IAM

2.1 Objetivos específicos

- Obter uma estrutura à base de polímeros sintéticos capaz de modificar a área de trabalho de eletrodos *screen-printed*;
- Caracterizar as estruturas poliméricas obtidas;
- Validar a modificação do eletrodo proposta;
- Otimizar e validar a fixação de anticorpos à superfície de trabalho;
- Verificar o reconhecimento de marcadores cardíacos CK-MB e TnIc pelos respectivos anticorpos;
- Construir uma curva de calibração para quantificar os marcadores cardíacos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o eletrodo comercial do modelo *screen-printed* DRP110 da marca DropSens® (Oviedo, Espanha). Esse modelo é constituído por três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho e um contra eletrodo, ambos feitos de grafite, e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Também foram utilizados potenciostatos portáteis comercializados pela PalmSens® (Houten, Holanda) modelos PalmSens3 e EmStat *Blue* operados pelo software PStTrace 5.8 para Windows®. A solução de ferricianeto/ferrocianeto $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5mM dissolvido em tampão cloreto de potássio (KCl) 100 mM com pH neutro foi utilizado como sonda eletroquímica para todos os testes.

3.1. Produção e caracterização das matrizes poliméricas

3.1.1. Obtenção das matrizes poliméricas

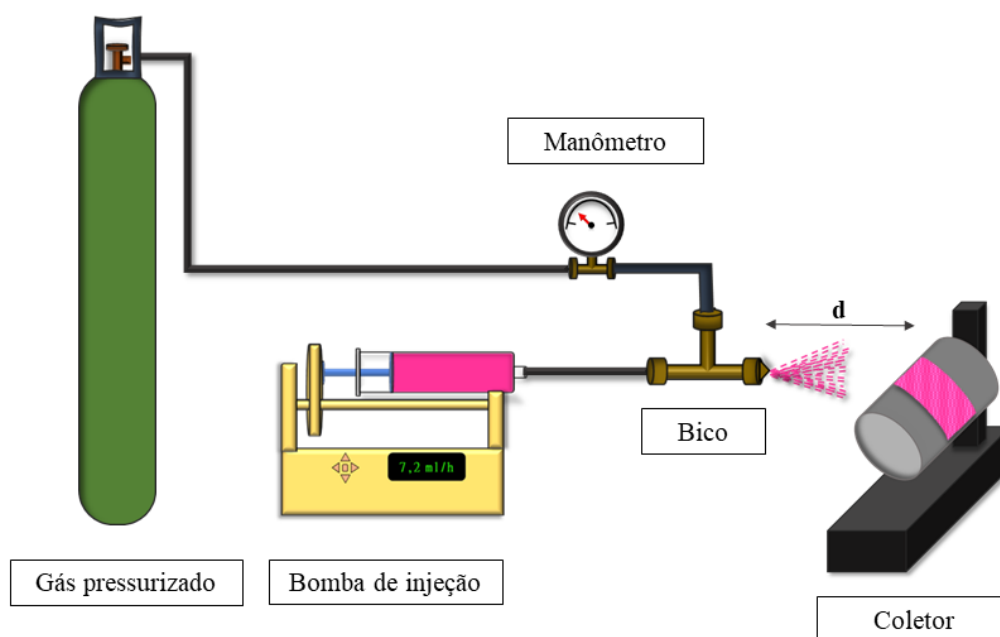
As matrizes foram produzidas no Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para a confecção utilizamos Polilático (PLA – 7500 g.mol^{-1}) obtido da Biomater (São Paulo, SP, Brasil) como polímero hidrofóbico. E, como polímero hidrofílico, o polietilenoglicol (PEG - 8000 g.mol^{-1}) obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para enriquecer as matrizes, utilizamos NTC comerciais e Rodamina 6G (R6G), ambos obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A mistura de polímeros foi solubilizada em Clorofórmio ($CHCl_3$).

As matrizes compostas pela blenda polimérica de PLA e PEG (PLA/PEG) foram enriquecidas de diferentes maneiras (de acordo com a tabela 1). A proporção dos polímeros se manteve constante para todas as situações e foram preparadas através da solubilização (15%, m/ v) em clorofórmio, na proporção de 30% (m/ m) do PEG em relação ao PLA. Quando enriquecidas, a R6G e o NTC foram adicionados a 1.0 % em peso em relação ao peso total do polímero (PLA / PEG) em solução. Nas técnicas de caracterização, a matriz contendo apenas polímero (PLA/PEG) foi utilizada como um controle.

Tabela 1. Composição das matrizes poliméricas

Amostra	Composição
NTC	PLA/PEG + NTC
R6G	PLA/PEG + R6G
NTC_R6G	PLA/PEG + NTC+R6G

As matrizes poliméricas foram obtidas via *Solution Blow Spinning* (SBS) conforme descrito por (MEDEIROS *et al.*, 2009). Os equipamentos utilizados para esse sistema consistem em: um compressor de ar; uma bomba de vazão para a ejeção da solução polimérica; um manômetro para controle da pressão; bicos concêntricos e um cilindro oco envolto em papel alumínio acoplado na posição horizontal a um agitador mecânico (figura 4).

Figura 4. Organização dos elementos para produção da matriz polimérica

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Os parâmetros de pressão, velocidade de ejeção, distância do coletor e velocidade de rotação foram fixados para todas as amostras. As matrizes foram formadas a uma pressão de 50 Psi, com uma ejeção de 7,2 mL. h⁻¹. O coletor foi posicionado a uma distância (d) de 10 cm a uma velocidade de rotação de 600 rpm.

3.1.1 Termogravimetria (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando-se o equipamento Shimadzu DTG 60 H em atmosfera de argônio a um fluxo de 50 mL. min⁻¹. As amostras, com um peso em torno de 10,0 mg, foram aquecidas em cadinho de alumínio a partir da temperatura ambiente até 600°C, com taxa de aquecimento de 10 °C. min⁻¹.

3.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC; SHIMADZU DSC-60Plus) foi realizada em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL. min⁻¹. As amostras com um peso em torno de 8,0 mg foram aquecidas em cadinho de alumínio a partir da temperatura ambiente até 180 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C. min⁻¹. Foi registrada a temperatura de fusão (T_m), a entalpia de fusão (H_m) e a temperatura de cristalização a frio (T_{cc}).

3.2 Modificação dos eletrodos utilizando as matrizes poliméricas

As matrizes foram recortadas em discos de aproximadamente 4 mm de diâmetro e 0,3 mm de espessura. Os discos foram posicionados na área de trabalho do eletrodo e para induzir a eletrodeposição. Foram feitas leituras consecutivas em voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de 0,1 V. s⁻¹. Depois das leituras, os discos foram descartados e os eletrodos lavados com água deionizada e secos com jatos de ar. Após esse processo, os eletrodos foram considerados estáveis e prontos para uso.

Como critério de comparação, uma solução de R6G foi usada também para estabilizar os eletrodos e em eletrodo previamente estabilizado. O teste foi feito utilizando uma alíquota de 2 µL de solução contendo 500 µg. mL⁻¹ de R6G diluída em água destilada, em cada eletrodo (RIELLO, 2019). Procedeu-se da mesma forma para a eletrodeposição dos polímeros.

3.3 Validação da modificação do eletrodo

Após as modificações dos eletrodos foram feitos testes para validar esse processo e verificar as características da superfície modificada.

3.3.1 Eficiência da superfície modificada

Após a modificação, foram feitos testes para avaliar se, além de estabilizar a superfície, a deposição dos polímeros na superfície do eletrodo também permitia a

deposição de moléculas ou nanomateriais. Nesses testes foram usados anticorpos (IgG) diversos, diluídos em PBS-1X, disponíveis no laboratório para uso em ensaios de detecção específica do tipo antígeno-anticorpo. Como um exemplo de nanomaterial a ser utilizado na construção de biosensores, usou-se nanocristais de ZnO:01Au numa concentração de 10 mg. mL^{-1} , dispersos em água destilada. Para o teste colocou-se $2 \mu\text{L}$ das soluções, tanto de anticorpo quanto de nanocristais, na superfície de trabalho dos eletrodos e esperou-se secar em temperatura ambiente (TA) por aproximadamente 5 minutos. Foi feita uma leitura em voltametria cíclica em velocidade de varredura de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

3.3.2 Cálculo da área ativa

Para calcular a área ativa do eletrodo antes e depois da modificação, foi utilizada a equação de Randles-Sevcik (equação I) para reações reversíveis a temperatura ambiente. Para isso, foram feitas voltametrias cíclicas nas velocidades de varredura de: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2 V.s^{-1} . A área geométrica do eletrodo de trabalho foi de $0,04\pi. r^2. \text{cm}^2$.

$$I_p = 2,69 \times 10^{-5} \cdot n^{3/2} \cdot A D_0^{1/2} \cdot C v^{1/2} \quad (\text{I})$$

Onde:

I_p = corrente máxima (em A);

n = número de elétrons na transferência no par redox (geralmente 1);

A = área do eletrodo (em cm^2);

D = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2. \text{s}^{-1}$);

C = concentração (mol. cm^{-3});

v = velocidade de varredura (V. s^{-1});

Os valores de pico de corrente (oxidação) foram substituídos na fórmula (I) e o valor de área para cada velocidade de varredura obtido. Esses valores foram então plotados em um gráfico de corrente por raiz quadrada da velocidade de varredura. A área para cada modificação foi obtida pela inclinação da reta formada com os valores obtidos.

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram feitas no laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU).

A morfologia das matrizes poliméricas e da superfície do eletrodo foram observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Marca Vega3 TESCAN) operado a 20 kV. Previamente às análises, as amostras tiveram suas superfícies recobertas com uma camada de 10 nm de ouro.

3.5 Montagem do biossensor

Para a montagem da plataforma foram utilizadas mais de uma estratégia para detecção dos marcadores cardíacos. As moléculas biológicas utilizadas estão listadas na tabela 2, bem como as siglas que foram usadas para identificá-las neste trabalho. Os anticorpos utilizados foram obtidos da empresa Abcam (Cambridge, Reino Unido). As amostras de soro foram obtidas no banco de amostras do laboratório, sendo utilizadas 10 amostras de soro negativo, paciente sem histórico de IAM e 8 positivas, amostras com diagnóstico de IAM confirmado pela quantificação de marcadores cardíacos. Os calibradores foram cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Trata-se de amostras de soro com quantidade conhecidas de troponina cardíaca (18 ng. mL⁻¹ de TnIc e 2 ng. mL⁻¹ de TnTc) ou de CK-MB (56,4 ng. mL⁻¹).

Em uma das estratégias empregadas, foram utilizadas partículas magnéticas esféricas de diâmetro nanométrico Pierce™ NHS-Activated Magnetic Beads (88827), adquiridas da empresa Thermo Scientific. As partículas já estavam ativadas com grupamento NHS e foram utilizadas para acoplar os anticorpos. O protocolo de acoplamento foi feito seguindo as orientações do fabricante disponível no sítio eletrônico da empresa.

Tabela 2. Identificação das biomoléculas que foram usadas nesse trabalho

Molécula	Identificação
Anti-Troponina I cardíaca (ab47003)	Anti-TnIc
Anti-Creatina Kinase MB (ab31832)	Anti-CKMB

Proteína Cardíaca Nativa Troponina I (0,9 mg. mL ⁻¹) (ab9936)	TnIc
Proteína Recombinante Humana Creatinoquinase porção MB (ab73647)	CKMB
Soro Negativo para IAM	Negativo
Soro Positivo para IAM	Positivo
Calibrador (Tnc)	Cal. A
Calibrador (CK-MB)	Cal. B
Anticorpo acoplado em partícula magnética	Bead-Ac

3.5.1 *Dot-Blot* para validação dos anticorpos

O reconhecimento das proteínas recombinantes pelos anticorpos foi validado por um ensaio do tipo *Dot-Blot*. Para isso, foi utilizada uma membrana de alta afinidade para proteína. O volume utilizado de amostra foi de 1 µL, para: proteína recombinante na concentração estoque e em três diluições decrescentes com fator de diluição 1:10 (TnIc, CKMB); anticorpo primário (anti-TnIc, anti-CKMB); anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina. Uma membrana foi preparada para cada marcador. As amostras foram pingadas sobre a membrana, em lugares diferentes e previamente identificados, e esperou-se secar. Depois que todas as amostras estavam secas, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio PBS-1X – 5% Molico® sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois da incubação, as membranas passaram por três lavagens com PBS-1X-0,05%Tween20 (tampão de lavagem) e foram incubadas novamente com o anticorpo primário correspondente de cada marcador numa concentração de 1:1000 (v/ v), diluído em PBS-1X. Antes da incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas novamente. O anticorpo secundário foi incubado numa diluição de 1:100 (v/ v) em PBS-1X. A revelação foi feita utilizando BCIP/NBT pastilha, preparado na hora, de acordo com as indicações do fabricante.

3.5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O acoplamento das partículas magnéticas aos anticorpos foi feito de acordo com o protocolo do fabricante e para validar o acoplamento, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) foi empregada. As leituras foram feitas utilizando o equipamento ATR-FTIR Cary 630 da marca Agilent. Foram utilizados 2 μL de amostras (anticorpo, partículas magnéticas e Bead-Ac), gotejadas na superfície do cristal na região de leitura do laser. A leitura foi feita depois que a amostra estava completamente seca. Cada amostra passou por 32 leituras nos comprimentos de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Essa técnica também foi utilizada na caracterização das matrizes poliméricas.

3.5.3 Teste sanduíche

A primeira estratégia de montagem da plataforma do biossensor foi chamada de sanduíche, isso porque foram utilizados dois anticorpos para detecção do antígeno de interesse. Essa estratégia foi feita utilizando apenas os anticorpos e as proteínas recombinantes. Adicionou-se 100 pg de anticorpo na superfície de trabalho do eletrodo estabilizado e, para a leitura, aguardamos que a amostra estivesse completamente seca (cinco minutos TA). Para a fixação do anticorpo, uma leitura em voltametria cíclica a $0,1\text{ V.s}^{-1}$ foi feita, depois o eletrodo foi lavado com água deionizada, seco com jatos de ar e armazenado em/à temperatura ambiente até a próxima etapa.

Depois da preparação do eletrodo, o complexo Bead-Ac (1 mg. mL^{-1}) foi incubado com a proteína recombinante diluída (concentração estoque e em diluição 1:10) em PBS-1X a 37°C durante 30 minutos em igual proporção de volume. Após a incubação, foi realizada precipitação com auxílio de um ímã de neodímio e o precipitado foi lavado duas vezes usando solução tampão PBS-1X. Na última lavagem, o precipitado foi ressuspendido em volume tal, de solução tampão, que a concentração final foi de $1\mu\text{g. }\mu\text{L}^{-1}$. Adicionou-se o complexo Bead-Ac levando em consideração a massa de bead ($1\mu\text{g}$) em cada área de trabalho. Como controle foi incubado o complexo Bead-Ac apenas com a solução tampão e com proteínas que não as respectivas do anticorpo acoplado (ex. anti-TnIc com CKMB e vice-versa).

O precipitado foi colocado sobre os eletrodos previamente preparados com os anticorpos e esperou-se até que a amostra estivesse completamente seca (cinco minutos TA). Depois de secos, os eletrodos foram lavados com água deionizada para retirar o que não se ligou. A leitura foi feita em voltametria cíclica $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.5.4 Detecção direta

Para o teste de detecção direta foram utilizadas amostras de soro positivas e negativas para IAM e calibradores comerciais (amostras de soro reconstituídas contendo concentrações conhecidas de Tnc ou CK-MB) O Cal. A foi diluído em soro negativo, considerando a concentração total de Tnc nos seguintes pontos: $20,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (concentração estoque); $10,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $5,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $4,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $2,5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $2,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1,2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $0,6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Com o Cal. B foram feitos os pontos $56,4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $28,2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $14,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $7,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $3,5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1,7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de CK-MB.

Depois de diluídas foram adicionados $2 \mu\text{L}$ de amostras na área de trabalho do eletrodo, esperou-se secar e a leitura foi feita em voltametria cíclica $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. As leituras foram feitas em quintuplicatas, cinco eletrodos foram preparados para a mesma situação. Para análise dos dados utilizamos a média de leitura.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 7.0 para Windows. O teste ANOVA foi realizado para múltiplas comparações com pós teste de Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas. Foram consideradas diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

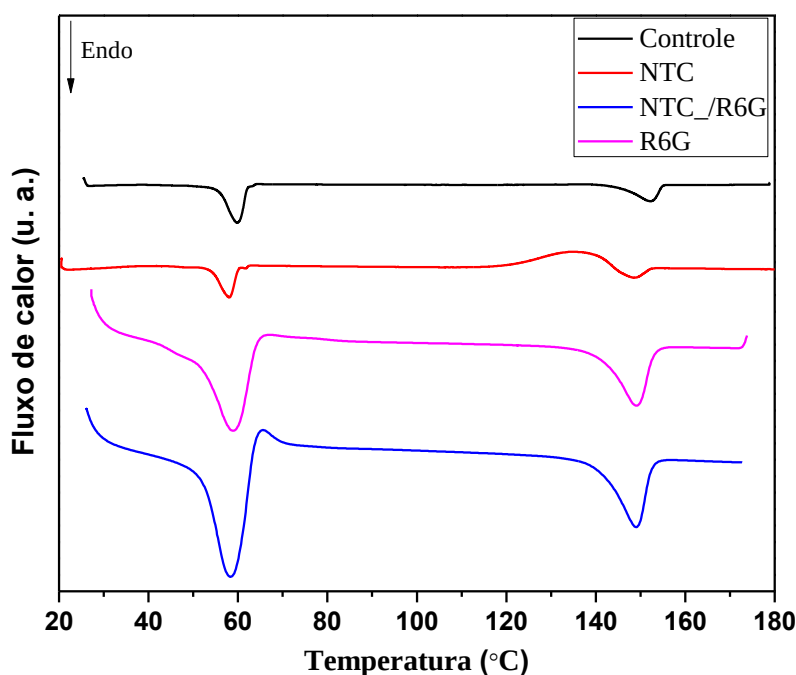
4.1. Caracterização das matrizes poliméricas

Antes de iniciar os testes com as matrizes poliméricas essas estruturas passaram por testes de caracterização para validar estrutura e assegurar a integridade após o processo de fabricação.

4.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As propriedades térmicas das matrizes poliméricas produzidas por SBS foram estudadas por DSC (figura 5 e tabela 3). A amostra PLA/PEG apresenta T_{m1} e T_{m2} bem definidas em 59 °C e 152 °C, respectivamente. Na T_{m1} ocorre a sobreposição da temperatura de transição vítrea (T_g) do PLA em torno de 63 °C e da T_m do PEG na

Figura 5. Calorimetria diferencial exploratória (DSC)



Cada grupo é uma matriz polimérica juntamente com a forma como foi enriquecida. Aquela considerada como controle não contém nenhum material adicional além dos polímeros que a constituem.

faixa de 45 °C a 60 °C (TONCHEVA *et al.*, 2016). Nenhuma modificação significativa foi observada nas T_{m1} e T_{m2} com as adições de R6G, NTC e na mistura de NTC_R6G. A T_{m2} corresponde à temperatura de fusão do PLA, que não sofreu nenhuma alteração com a inserção do PEG.

O NTC apresentou influência na cristalização antes da T_{m2} , relacionada com a recristalização de cristais imperfeitos a perfeitos do PLA, conforme observado por

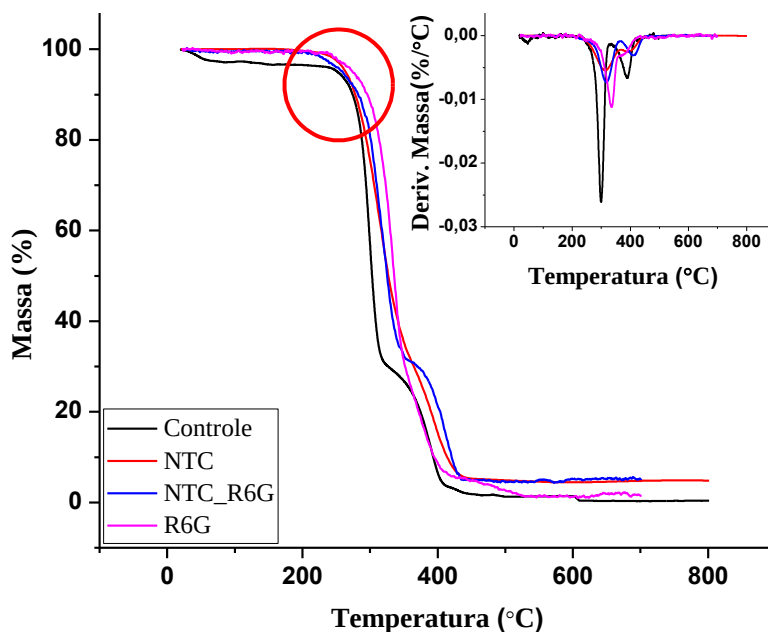
RESTREPO *et al.* (2018). Enquanto a incorporação de R6G provavelmente dificultou a mobilidade da matriz polimérica impossibilitando a recristalização.

Tabela 3. Propriedades térmicas de matrizes enriquecidas a partir de curvas DSC. A amostra controle é a matriz contendo apenas PLA e PEG

Amostra	T _{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T _{cc} (°C)	T _{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)
Controle	59	34	-	152	22
NTC	58	35	135	148	18
NTC_R6G	59	41	-	149	20
R6G	59	39	-	149	21

4.1.2 Análise termogravimétrica (TG)

A estabilidade térmica das matrizes poliméricas produzidas por SBS foram analisadas através da termogravimetria (TG). As curvas de TG e DTG das matrizes são mostradas na figura 6 e os dados de degradação apresentados na tabela 4. Matrizes contendo apenas PLA e PEG degradam em uma única etapa, com temperaturas de degradação iniciando em cerca de 376 °C e 349 °C (CHEN *et al.*, 2013). Observa-se que materiais compostos por esses dois polímeros possuem duas etapas de degradação, correspondentes à degradação do PEG inicialmente, e posterior degradação do PLA. A matriz de PLA/PEG possui a primeira etapa de degradação em 282 °C e a segunda em 368 °C.

Figura 6. Análise termogravimétrica das matrizes.

Cada grupo é uma matriz polimérica juntamente com a forma como foi enriquecida. Aquela considerada como controle não contém nenhum material adicional além dos polímeros que a constituem.

Observa-se que a adição de NTC e de R6G permaneceu com duas etapas de degradação, porém alterou o intervalo de degradação, que passou de 270 °C a 301 °C para o PEG e de 380 °C a 400 °C para o PLA. A temperatura de trabalho utilizada para aparelhos de análises geralmente é a temperatura ambiente ~25 °C, temperatura abaixo das T_{onset} das matrizes enriquecidas, garantindo a estabilidade térmica dos materiais produzidos pela técnica SBS.

Tabela 4. Parâmetros TG e DTG das matrizes. A amostra controle é a matriz contendo apenas PLA e PEG.

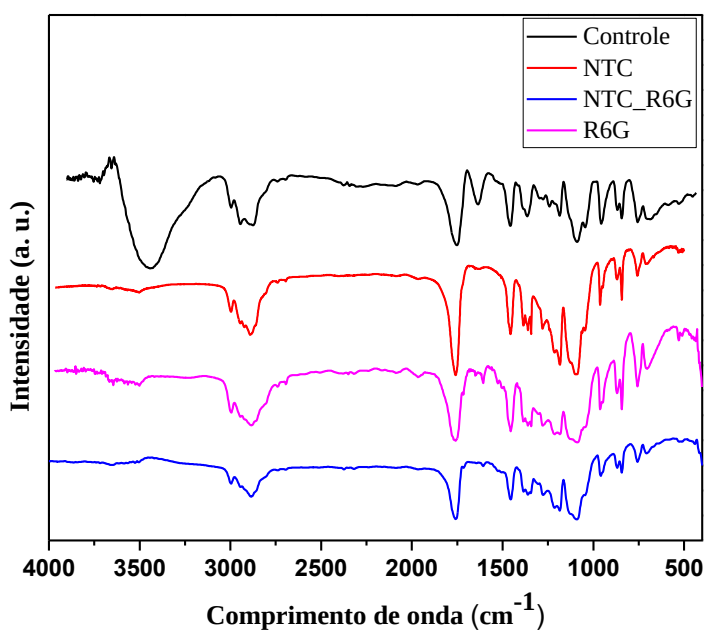
Amostra	Tonset I (°C)	Tmáx I (°C)	Loss I (%)	Tonset II (°C)	Tmáx II (°C)	Loss II (%)
Controle	282	333	73	368	389	26
NTC	270	314	62	340	392	36
NTC_R6G	289	318	65	335	400	30
R6G	301	333	73	326	380	26

4.1.3 Caracterização espectroscópica por infravermelho

As frequências de absorção no infravermelho do grupo funcional característico dos materiais são mostradas nos espectros de FTIR na figura 7. A curva do PLA/PEG apresenta picos em 3422 cm^{-1} , 2945 cm^{-1} , 1747 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} e 1080 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às vibrações de estiramento hidroxila (-OH), ao alongamento do -CH, ao alongamento do C=O, a torção do -CH e ao alongamento do -CO (DANAFAR *et al.*, 2014; DANAFAR *et al.*, 2017). A inserção de NTC e de R6G reduziu a intensidade do pico 3422 cm^{-1} pertencente às vibrações de estiramento hidroxila (-OH), porém, não alteraram consideravelmente os espectros das amostras obtidas, fato que pode estar relacionado com a porcentagem em massa adicionada (1%), o que dificultou a detecção dos dois materiais por meio da caracterização espectroscópica por infravermelho. A análise por infravermelho é ineficiente na caracterização de ligações homoatômicas, somada à baixa quantidade de NTC

Figura 7. Caracterização espectroscópica por infravermelho

podem ter impedido a avaliação da incorporação do material à amostra, como observado por RODRIGUES & GALZERANI (2012).



Cada grupo é uma matriz polimérica juntamente com a forma como foi enriquecida. Aquela considerada como controle não contém nenhum material adicional além dos polímeros que a constituem.

Uma vez que a caracterização confirmou que houve modificação das matrizes, o processo de enriquecimento foi eficiente e a estabilidade foi confirmada esse material foi considerado apto para ser utilizado nos testes de modificação dos eletrodos.

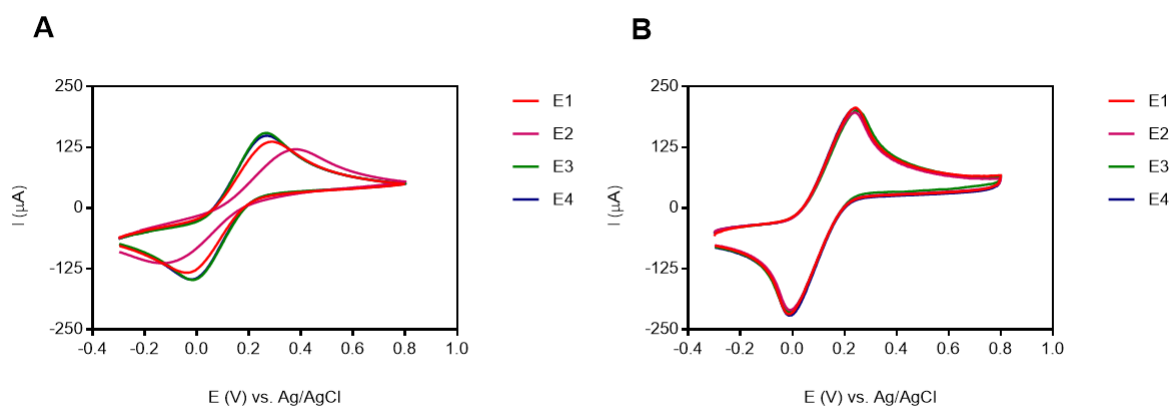
4.2 Processo de modificação dos eletrodos utilizando matrizes poliméricas

4.2.1 Estabilização da superfície de trabalho

O processo de padronização da fabricação das mantas foi feito com base na metodologia já descrita por FERREIRA (2017). A velocidade em que o líquido é dispensado interferiu diretamente na característica das fibras formadas. Outro parâmetro importante observado foi a pressão no bico, isso porque está diretamente relacionada com a capacidade de evaporação do solvente e espessura das fibras (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

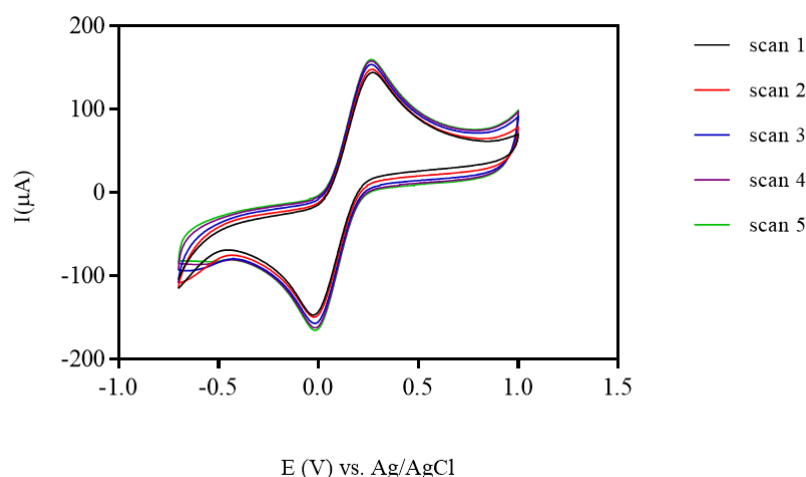
Após as adaptações, a matriz obtida com proporção 70:30 de PLA:PEG e enriquecida com NTC e/ou R6G mostrou-se eficiente para estabilizar os eletrodos, homogeneizando a superfície de trabalho. O efeito dessa estabilização pode ser observado na figura 8.

Figura 8. Voltamogramas de eletrodos virgens e modificados



Gráficos representativos da leitura de Ferricianeto/Ferrocianeto 5mM em KCl 100mM em voltametria cíclica. Em (A) estão as leituras de 4 eletrodos sem tratamento e em (B) a leitura dos mesmos 4 eletrodos após o tratamento com a manta polimérica. Nesse teste a manta utilizada foi enriquecida com NTC

O eletrodo foi considerado estável quando as leituras começaram a coincidir, ou se sobreporem (figura 9). Cinco voltas foram suficientes para estabilizar a superfície do eletrodo. Além de estáveis, após a utilização das matrizes os eletrodos foram considerados modificados, pelo fato de ter material adsorvido em sua superfície.

Figura 9. Número de ciclos necessários para estabilizar o eletrodo

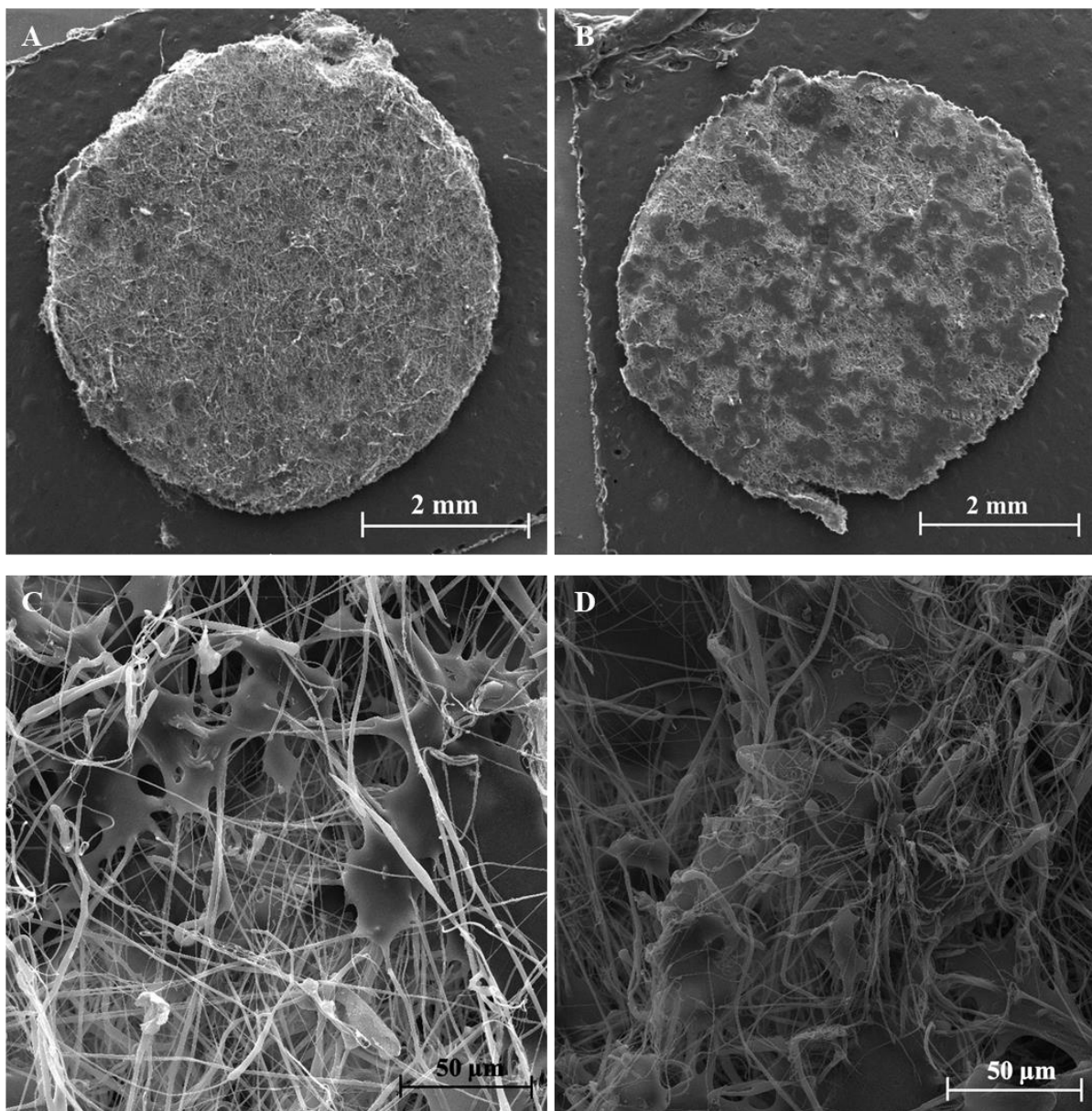
Voltamograma cíclico do ferricianeto/ferrocianeto 5mM em KCl 100mM durante a modificação do eletrodo de grafite com manta polimérica enriquecida com NTC.

A hipótese elaborada inicialmente para a maneira como a matriz seria capaz de modificar a superfície do eletrodo era de que haveria deposição de polímero na superfície do grafite. Sabe-se que o PEG que está na composição da matriz é um polímero hidrofílico, por esse motivo tende a se degradar quando colocado em meio aquoso. Essa característica de degradação gradativa, associando polímeros de comportamentos diferentes é, inclusive, utilizada em outras aplicações, como a liberação controlada de drogas (DAUM *et al.*, 2012; PRAJAPATI *et al.*, 2019).

A decomposição do polímero pode também ser observada nas imagens de MEV feitas da matriz antes e depois de serem utilizadas na modificação do eletrodo. A figura 10 mostra uma imagem em menor aumento da característica do disco que é utilizado sobre o eletrodo. O disco antes do tratamento (figura 10A) parece ter uma superfície mais irregular e com maior quantidade de fibras aparente, o que mostra a integridade da matriz, uma vez que ela é composta por fibras de diâmetro nano e micrométricos. Quando se compara com o disco mostrado na figura 10B, depois de ser usado para a modificação do eletrodo, é possível ver regiões com aparência menos rugosa e mais lisas.

A face observada do disco é a mesma que entrou em contato com a superfície do eletrodo. Observando essas mesmas imagens em um maior aumento, é possível ver que antes da utilização da matriz há maior integridade das fibras (figura 10C). O mesmo não acontece depois da utilização, onde pode ser observado mais fibras rompidas e desorganizadas (figura 10D).

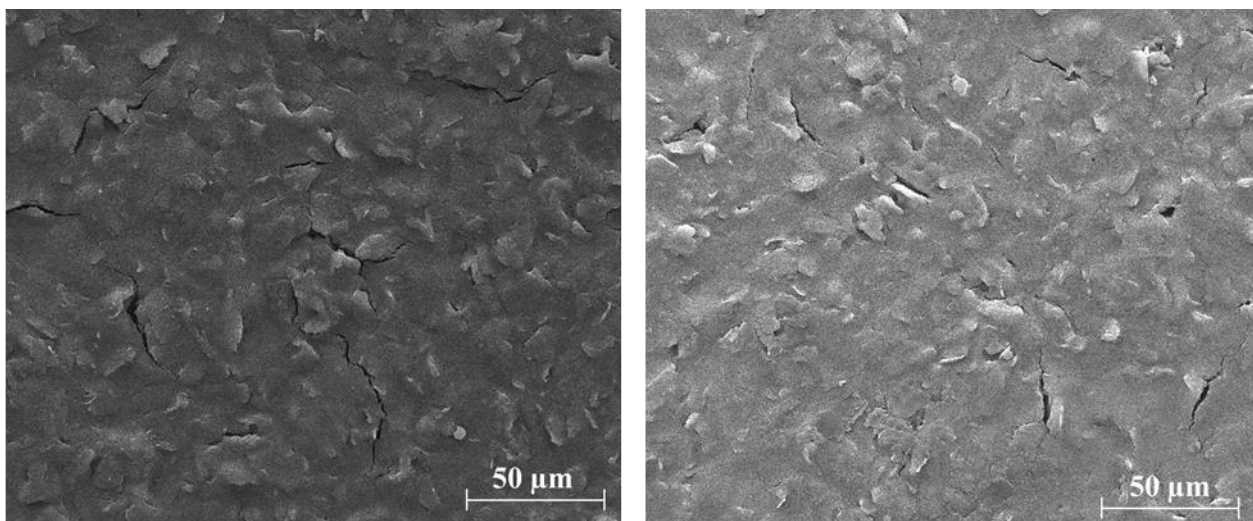
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das matrizes



Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das matrizes antes (A e C) de serem utilizadas na modificação do eletrodo e depois (B e D).

Sabendo que de fato existe a degradação dos polímeros e, conseqüentemente, da matriz, buscamos avaliar se o polímero poderia ficar depositado na superfície do eletrodo, possivelmente corrigindo as imperfeições da superfície, causadas pela forma como o eletrodo é confeccionado (figura 11).

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho



Em (A) eletrodo sem tratamento, em (B) eletrodo após o tratamento com a matriz polimérica

As análises de MEV indicaram que a possível deposição de um filme na superfície do eletrodo não é capaz de alterar a morfologia do grafite, mas, de alguma maneira, é capaz de modificar os sítios de ligação ali presentes, como observado nos testes a seguir.

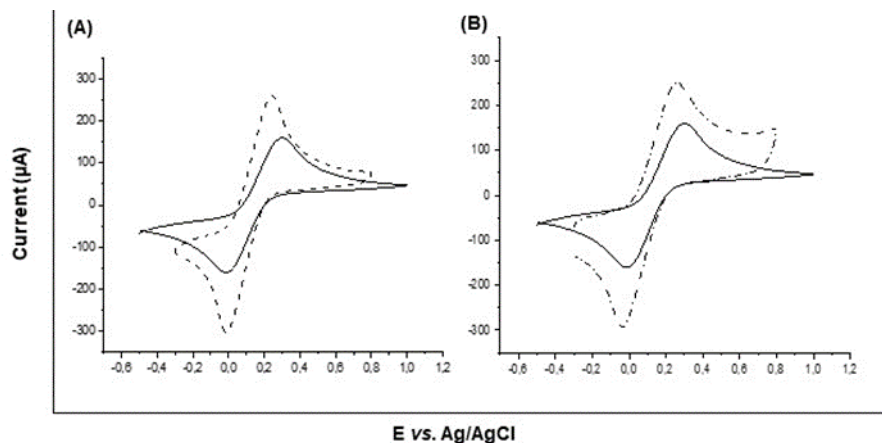
4.2.2 Eficiência de modificação

Sabe-se que o processo eletroquímico aqui observado se dá pela interação das moléculas oxidadas ou reduzidas com a superfície do eletrodo, interface da solução (FERNANDES & KUBOTA, 2001). Por ser um processo dinâmico quando as reações que acontecem na interface se repetem, isto é, o processo que antes era oscilante agora adquire uma certa estabilidade, repetibilidade de interação, e o eletrodo passa a ser considerado estável.

O eletrodo modificado com a matriz polimérica, além de estável, foi eficiente para se depositar tanto nanomateriais, quanto biomoléculas. Essa característica é uma vantagem dessa maneira de estabilização, pois além de simples quando comparada com estabilizações que levam um tempo maior, por precisarem de grande quantidade de ciclos, a possibilidade de se depositar nanomateriais abre a possibilidade para se montar diferentes plataformas de biossensores. Há uma diversidade de estudos que propõem diferentes formas de se utilizar nanomateriais associados a componentes biológicos com a finalidade de melhorar o sinal capturado. As matrizes aqui utilizadas são uma forma simplificada de entrega de material à superfície que se quer modificar (XIE *et al.*, 2007; HORIKAWA *et al.*, 2011; CARLOMAGNO *et al.*, 2020).

A deposição de anticorpo no eletrodo modificado foi eficiente. Com um aumento de sinal característico observado (figura 12).

Figura 12. Voltamogramas cíclicos de eletrodos virgens, modificados e com anticorpo adsorvido



Voltamogramas de eletrodos virgens (linha contínua em A e B), eletrodo modificado (linha pontilhada em A) e eletrodo com anticorpo depositado (linha pontilhada em B).

Analisando a deposição de ZnO:1Au em eletrodos sem modificação, é possível perceber que houve uma distribuição menos homogênea desses nanocristais quando comparada com a distribuição no eletrodo com tratamento (figura 13A-D).

A forma como os nanocristais se distribuíram na superfície do eletrodo afetou também o sinal do ferricianeto/ ferrocianeto (figura 13D-E) onde são comparados voltamogramas de três eletrodos não tratados e tratados com os nanocristais depositados. Os eletrodos que não receberam modificação prévia, embora tenham recebido a mesma quantidade de nanocristal, apresentaram leituras diferentes, ao passo que aqueles que foram modificados, tiveram um comportamento igual no par redox da sonda eletroquímica.

A sonda eletroquímica escolhida (ferricianeto/ferrocianeto) já é bem estabelecida e possui um comportamento eletroquímico conhecido e bem caracterizado, sendo, portanto, uma escolha confiável na hora de condicionar eletrodos modificados. Observa-se que a utilização de nanomateriais em eletrodos sem o tratamento prévio alterou esse padrão, com um espaçamento entre o potencial de oxidação e de redução. Descaracterizando o sistema e mostrando a ineficiência dessa estratégia. E, validando a modificação aqui proposta.

Em reações heterogêneas como a que é vista nesse trabalho, reações com interação entre fases termodinamicamente diferentes (reações entre soluções eletroativas e eletrodos polarizados) os íons permanecem livres em solução e

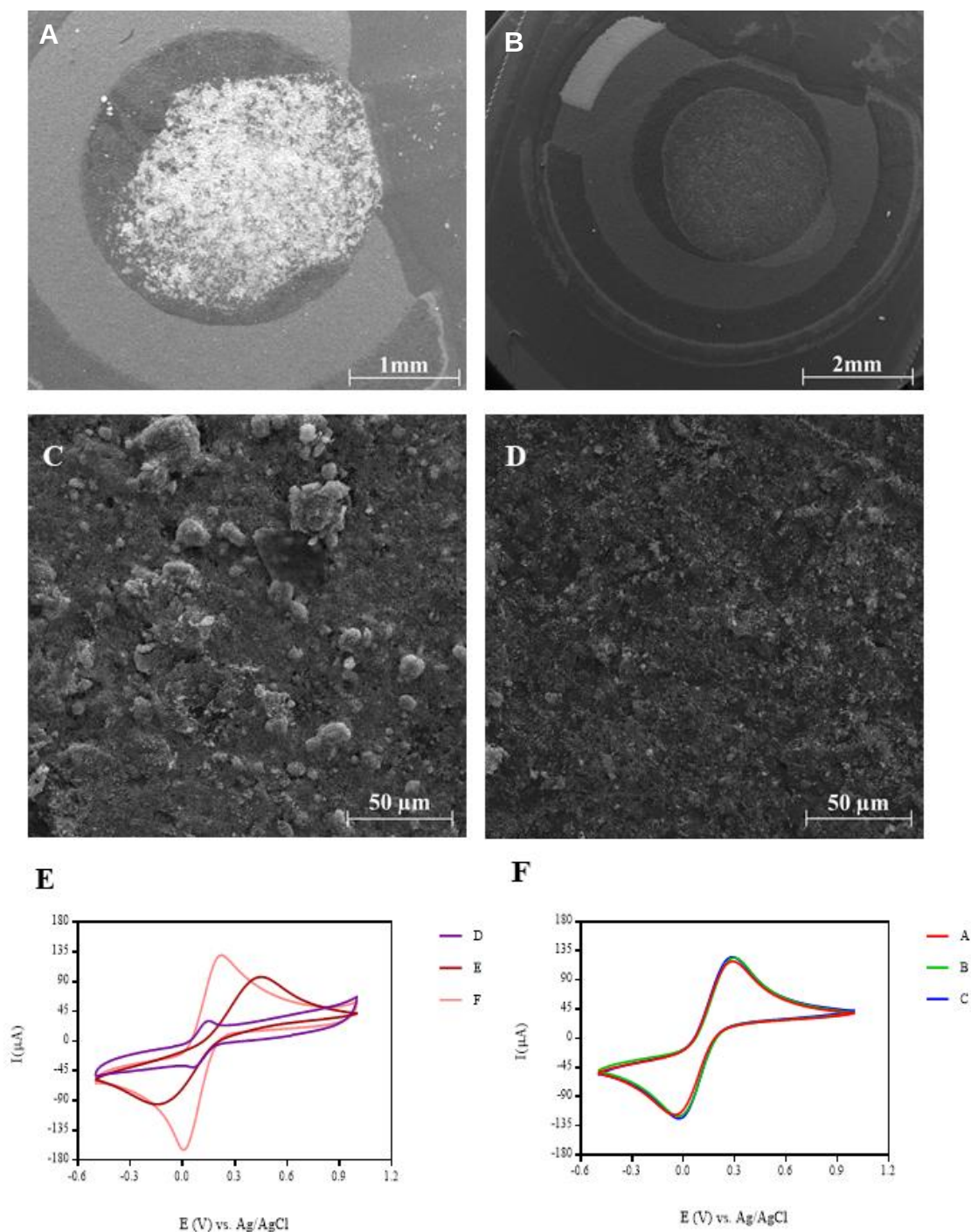
realizam troca de elétrons ao se aproximarem da dupla camada elétrica (justaposta ao eletrodo). Nesse caso, é possível que modificações na superfície do eletrodo com a formação de filmes poliméricos dificulte essa interação (MARCUS, 1956)

Embora haja a possibilidade de bloqueio de sinal ocasionado pela modificação, a utilização de polímeros condutores, associados ou não a nanomaterias, para a formação desses filmes é uma possibilidade explorada para reverter essa situação. A depender das características físico-químicas do material utilizado, pode haver maior interação entre a sonda eletroquímica e a dupla camada elétrica. Além de não prejudicar pode levar, inclusive, a um aumento dessa interação, (POURGHOBADI *et al.*, 2020).

Na eletropolimerização, técnica utilizada para depositar um material sobre a superfície do eletrodo, o sistema é submetido a sucessivos ciclos de corrente em intervalos de potencial pré-determinado (OUIS *et al.*, 2017; CRUZ, 2018). Nesse estudo, propõe-se então a eletrodeposição de PEG e outros materiais usando matrizes de blendas poliméricas como um veículo de entrega do material à superfície do eletrodo.

A imobilização de eletrodos e a comparação dos voltamogramas aqui apresentados contrariam a possibilidade de o filme polimérico formado causar um bloqueio de sinal de maneira prejudicial à transferência de elétrons da reação. Ainda assim, mais testes que caracterizam a interface do sistema foram feitos, como o cálculo da área ativa do eletrodo.

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho modificado com nanocristais

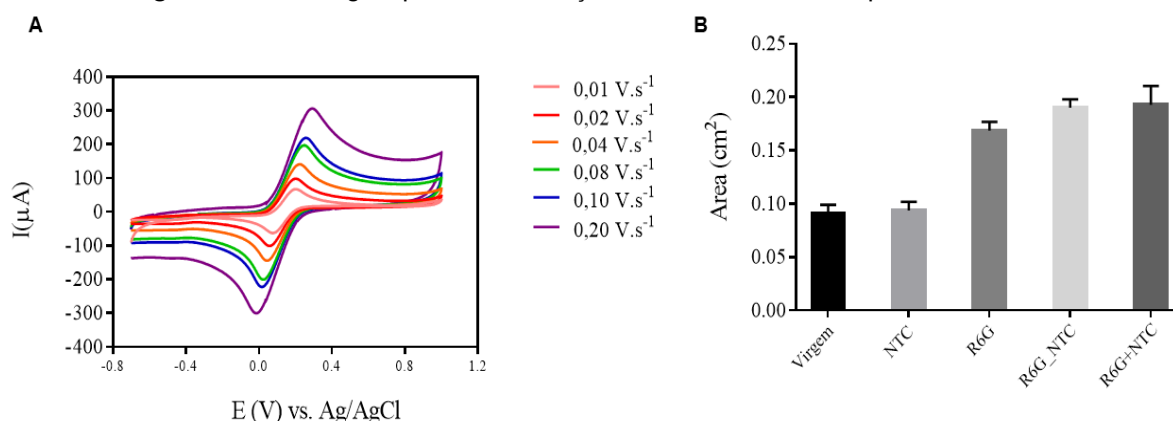


Em (A) e (B), eletrodos com nanocristais de ZnO:1Au a 10mg/mL depositados na superfície sem tratamento prévio e com tratamento, respectivamente. Em (C) eletrodo sem tratamento prévio e (D) eletrodo com tratamento prévio a área de trabalho com nanocristais depositados vistas em maior aumento. Em (E) o voltamograma cíclico do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM em eletrodos apenas com nanocristais depositados e em (F) os eletrodos receberam tratamento prévio antes da deposição dos nanocristais.

4.2.3 Área ativa do eletrodo

Foram feitas leituras sucessivas de voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura para avaliação da área ativa do eletrodo após sua modificação. Essa área foi calculada usando o Teorema de Randles-Sevcik para reações reversíveis.

Figura 14. Estratégias para estabilização e a área ativa correspondente



Em (A) voltamogramas cíclicos com as diferentes velocidades de varredura para utilização do Teorema de Randles-Sevcik. Em (B) quantificação das áreas calculadas em eletrodos com e sem modificação.

É postulado que nesse tipo de reação o pico de corrente varia de maneira linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Nessas reações, a velocidade da reação é suficientemente alta a ponto de estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface. Por ser rápida, apenas a etapa de transferência de massa determina o que acontece no processo. Dessa forma, o pico de oxidação foi considerado para obtenção dos valores de área ativa do eletrodo. Conclui-se que a modificação interferiu apenas na transferência de carga por parte da sonda eletroquímica (MARCUS, 1956; NGAMCHUEA *et al.*, 2014).

A matriz enriquecida com R6G não teve resultados satisfatórios, não sendo utilizada além dos testes iniciais de estabilização. Porém, trabalhos anteriores deste mesmo grupo de pesquisa, demonstraram que esse tratamento tem benefícios na adsorção de moléculas, portanto, foi criado um grupo com um passo a mais de estabilização (RIELLO, 2019). A R6G foi adicionada em eletrodos previamente estabilizados com matriz enriquecida apenas com NTC compondo o grupo que foi chamado de R6G+NTC. Esse grupo foi utilizado a partir daqui e se mostrou mais eficiente para aumentar a área de trabalho e melhor fixação de anticorpo (dados não mostrados).

Observou-se que essa área ativa aumentou de acordo com as formas de enriquecimento da matriz polimérica, assim como pode ser observado na figura 14B. A matriz polimérica enriquecida com NTC apresentou um aumento discreto quando comparado com o eletrodo sem tratamento. Quando a matriz foi enriquecida com R6G esse aumento ficou mais evidente, assim como quando houve a associação desses dois compostos.

Outra característica observada foi a associação dos compostos, tanto na confecção da manta (R6G_NTC), quanto no processo de modificação (R6G+NTC). Quando a associação ocorreu no processo de modificação, a adsorção de moléculas na superfície de trabalho foi mais eficiente (figura 15). Além de melhorar a capacidade de adsorção, houve um aumento no sinal do eletrodo, isto é, com maiores valores de correntes para os picos de oxidação e redução do par redox, fato que corrobora com o aumento da área ativa do eletrodo.

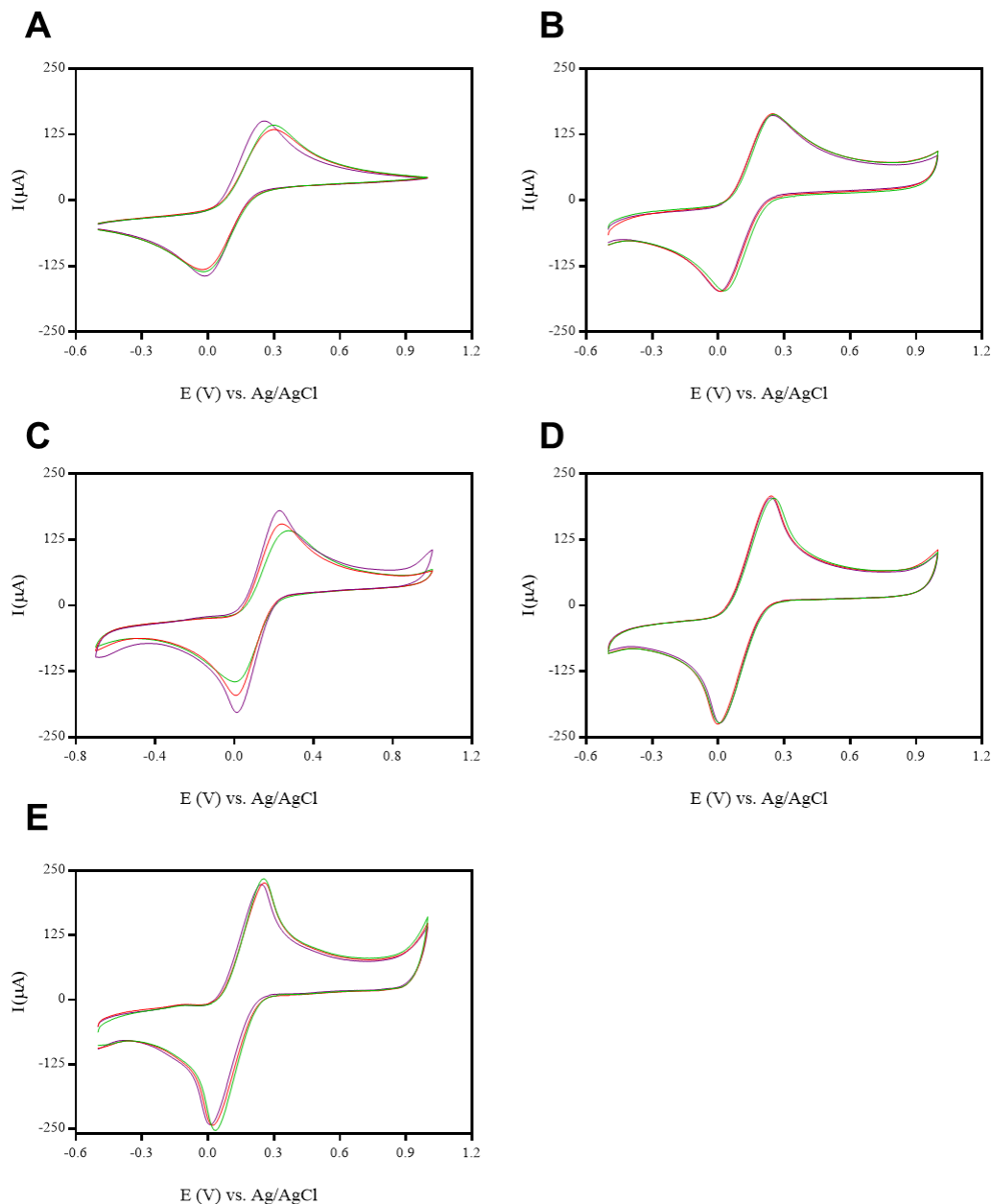
O fator de rugosidade também apresentou aumento, com as diferentes formas de modificação e/ou enriquecimento da matriz polimérica. Sabe-se que o cálculo do fator de rugosidade se dá pela fórmula da equação II:

$$\text{Fator de rugosidade} = \frac{\text{área calculada}}{\text{área geométrica}} \text{ (II)}$$

Ao se considerar a fórmula, nota-se que o fator de rugosidade é diretamente proporcional à área calculada. Como há um aumento na área calculada, espera-se que realmente haja aumento no fator de rugosidade desses eletrodos, o que pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5. Fator de Rugosidade calculado a partir da área obtida após cada modificação em relação à área geométrica do eletrodo de trabalho.

Tratamento	Fator de Rugosidade
S/ tratamento	0,700
NTC	0,721
R6G	1,295
R6G_NTC	1,460
R6G + NTC	1,480

Figura 15. Voltamogramas cíclicos para cada uma das modificações utilizadas

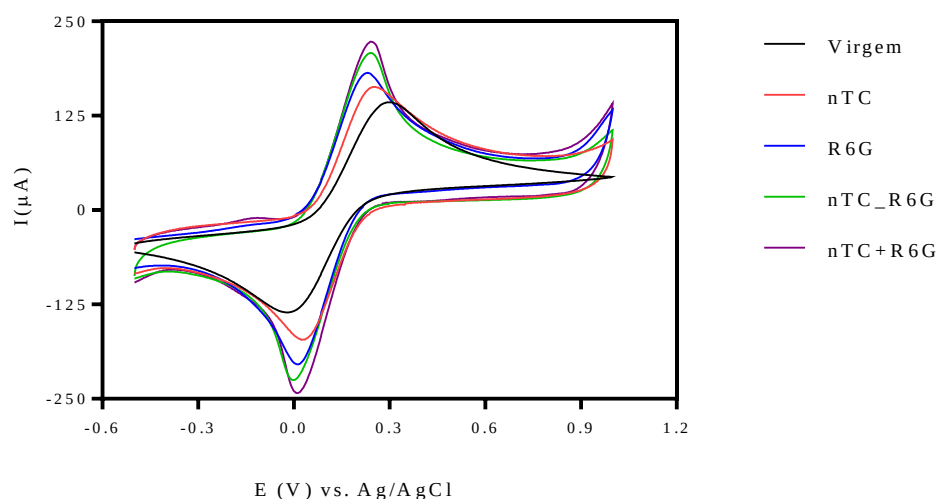
Voltamogramas cíclicos do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM para cada modificação, leitura de três eletrodos diferentes em cada um dos casos. Em (A) eletrodo sem modificação. Em (B) eletrodo modificado com matriz polimérica enriquecida com NTC. Em (C) modificação apenas com o composto orgânico R6G. Em (D) matriz enriquecida com NTC e R6G no processo de fabricação da matriz. Em (E) matriz enriquecida com NTC e acréscimo do composto R6G após a primeira modificação

O composto R6G, quando adicionado sozinho, sem tratamento prévio com a matriz polimérica, já foi utilizado anteriormente como opção para modificar e estabilizar a superfície do eletrodo (RIELLO, 2019). Observou-se, contudo, que a reprodutibilidade nessa situação foi menor, uma vez que ela depende de preparo de soluções e da habilidade do operador para que haja uma distribuição homogênea na

superfície do eletrodo (figura 15C). Quando o eletrodo foi tratado previamente, esse problema pareceu ser corrigido (figura 15E).

Comparando todas as formas de estabilização aqui mencionadas é possível concluir que o tratamento em duas etapas, primeiro com a matriz de NTC e R6G adicionado foi aquele que obteve o melhor resultado (NTC+R6G) como mostra a figura 16. Essa foi a opção de modificação escolhida para os eletrodos nos testes seguintes.

Figura 16. Comparação entre o voltamograma cíclico das modificações no eletrodo



Não é a primeira vez que é descrito a associação de compostos para deposição simultânea e modificação de superfícies. PARNELL *et al.* (2019) propôs a associação de óxido de cobalto e polipirrol, um polímero orgânico obtido com a associação de polímeros de pirrol, para modificação da superfície de eletrodos de trabalho para confecção de super capacitores. Embora os trabalhos tenham aplicações diferentes, os comportamentos observados e a forma de obtenção do filme são similares. Nesse mesmo estudo, a eficiência e estabilidade do filme formado foi avaliado por análises de voltametria cíclicas, assim como apresentado aqui neste trabalho.

A R6G é um corante fluorescente derivado de xanteno, utilizado para aprimorar sinal em técnicas de detecção ótica e em algumas técnicas de microscopia (HILDEBRANT & STOCKBURGER, 1984; WANG *et al.*, 2004).

Pode-se transportar a eficiência desse composto, já observado em outras técnicas, com o resultado aqui encontrado. ROOYANIAN *et al.* (2018) sugeriu uma nova via de funcionalização de eletrodos para detecção de compostos específicos,

utilizando óxido de grafeno reduzido associado ao ácido benzóico. De acordo com o banco de dados PubChem, disponível online, esse ácido possui similaridade com R6G. Já o óxido de grafeno, nanotubo de carbono e grafite são alótropos de carbono, isto é, são diferentes organizações estruturais de átomos de carbono (C). Esses dados corroboram a eficiência da utilização de R6G associada a polímeros enriquecidos com NTC para funcionalizar eletrodos de grafite observado e proposto nesse trabalho.

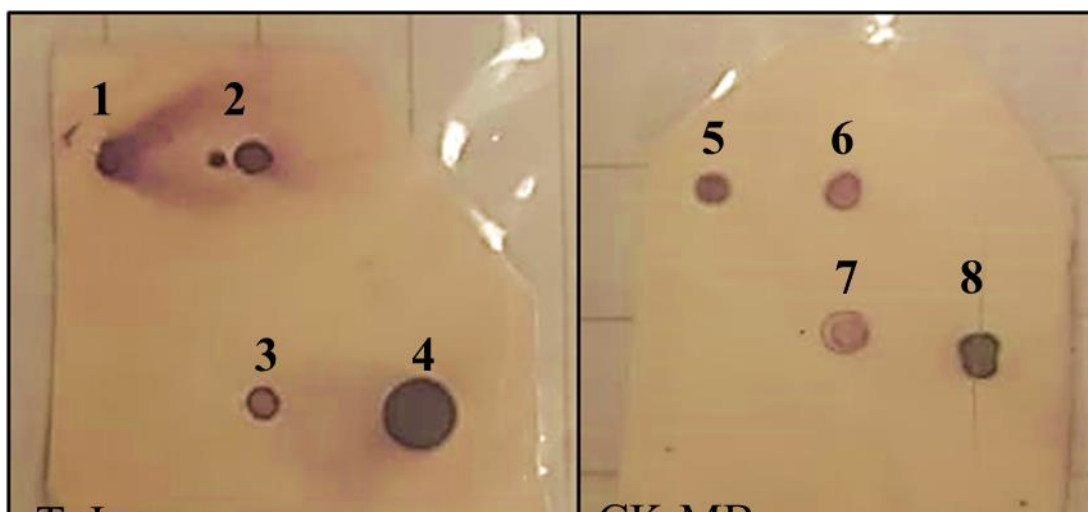
4.3 Montagem do biossensor

A reprodutibilidade e estabilidade encontrada no tratamento observado permitiu a criação de uma plataforma para um biossensor diagnóstico. O tratamento foi eficiente na adsorção de moléculas e, a partir disso, deu-se início a montagem de um biossensor para identificação de marcadores para IAM. Para a detecção simultânea de marcadores, eletrodos com duas ou mais áreas de trabalho podem ser utilizados, com o tratamento individual de cada eletrodo, de acordo com o reconhecimento de interesse. Por esse motivo, os testes foram feitos em eletrodos com uma única área de trabalho e a padronização individual para cada marcador.

4.3.1 Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante pelo Ac

Os anticorpos Anti-TnIc e Anti-CKMB foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes, tanto na concentração estoque, como na diluição 1:10 (figura 17). Essas concentrações foram usadas como parâmetros para os demais testes.

Figura 17. Imagem da membrana do ensaio *Dot-blot*

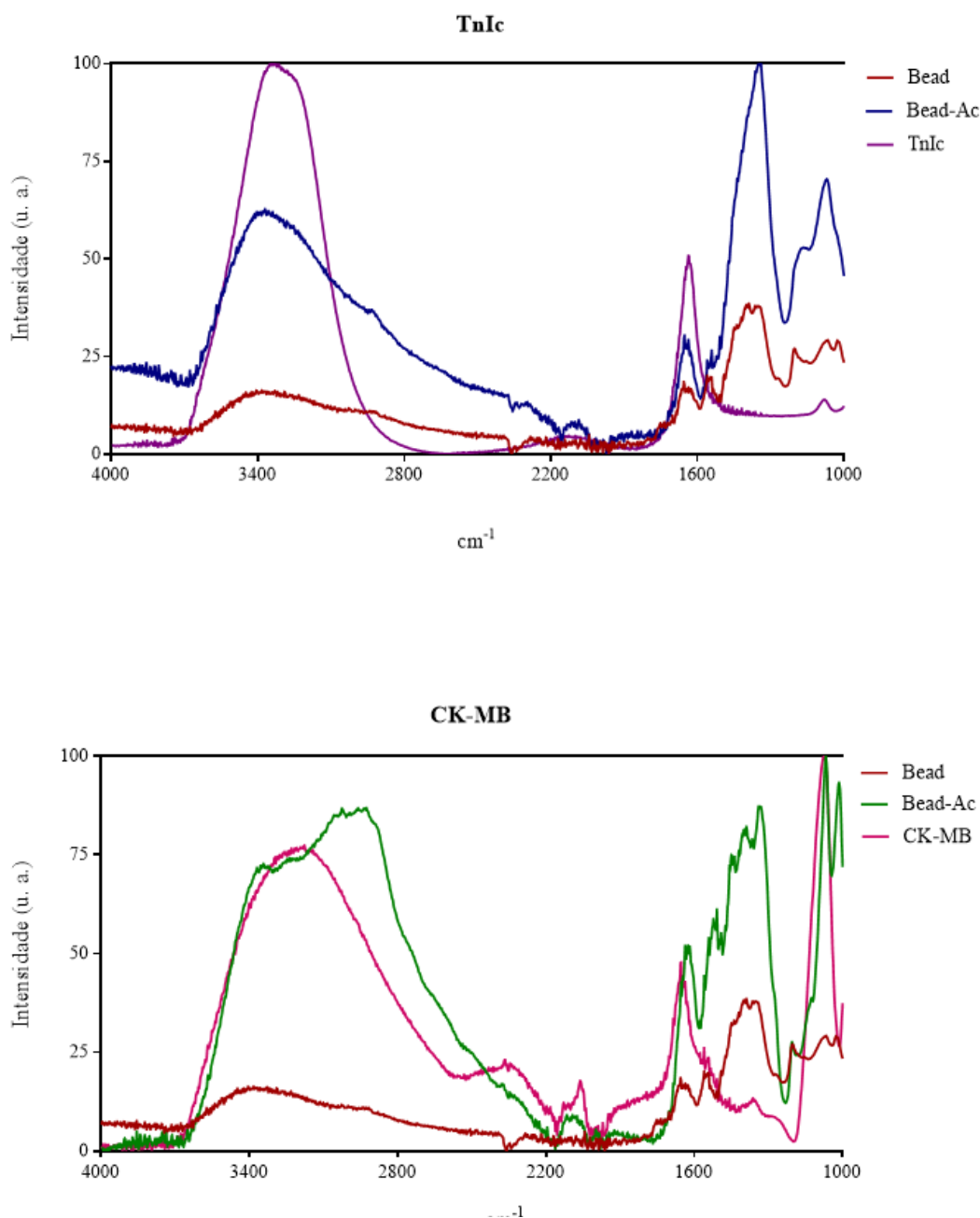


Em 1 e 2, os pontos de reconhecimento de TnIc em concentração estoque e na diluição 1:10, respectivamente. 3 e 4 são os controles da reação. Os pontos 5 e 6 são as concentrações estoque e diluição 1:10 de CK-MB, respectivamente. 7 e 8 são controles da reação.

4.3.2 Conjugação do Anticorpo à partícula magnética

A conjugação do anticorpo com a bead foi validada usando o ATR-FTIR. Como é possível observar a mudança nos espectros na área destacada no gráfico da figura 18, pode-se afirmar que a ligação foi eficiente.

Figura 18. Análise de ATR-FTIR da conjugação dos anticorpos com a bead magnética



Gráficos representativos da análise de ATR-FTIR da conjugação do Anti-TnIc com a partícula magnética (A) e do Anti-CKMB (B).

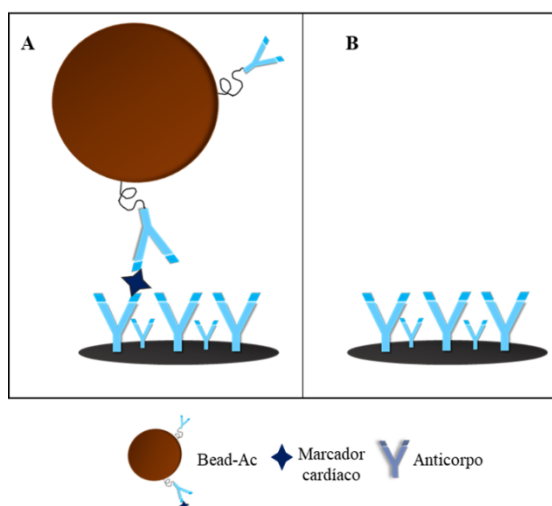
Analisando apenas o perfil dos espectros é observada uma variação de picos na região de 1600 a 1000 cm⁻¹ nos dois gráficos. A validação da conjugação foi

importante como um passo controle para os testes que foram feitos utilizando esse complexo.

4.3.3 Teste Sanduíche

Para esses testes foram utilizadas as proteínas recombinantes (CK-MB e Tnlc). Como observado em resultados anteriores, a adsorção de anticorpos no eletrodo modificado foi eficiente. O desenho do experimento se deu como mostrado no esquema da figura 19.

Figura 19. Esquema ilustrativo do teste sanduíche



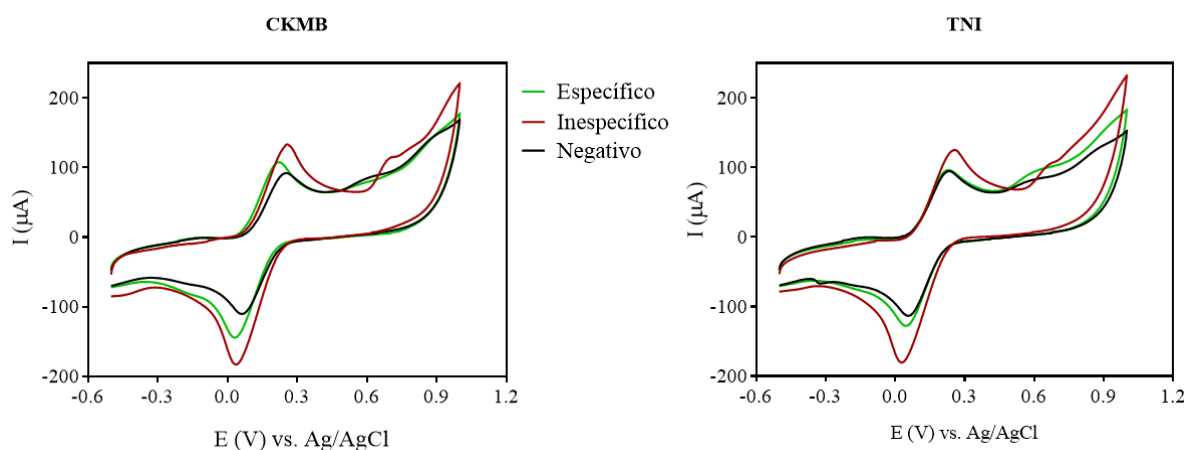
Em A uma representação de reconhecimento específico e em B uma representação de caso negativo, onde não há ligação pois não há reconhecimento do antígeno pelo anticorpo de captura.

O teste foi capaz de diferenciar amostras positivas, onde há reconhecimento específico, de amostras negativas, onde não há reconhecimento de antígeno pelo anticorpo e, portanto, não há o complexo Bead-Ac presente. Essa diferença é observada no pico de redução dos voltamogramas da figura 20.

Como a proposta do trabalho envolve o reconhecimento de mais de um marcador cardíaco de maneira simultânea, foi avaliado o reconhecimento cruzado dos anticorpos, tendo em vista que na prática clínica é provável que haja a presença de um ou mais marcadores. Para verificar a especificidade da estratégia proposta, se há ou não reconhecimento cruzado, foi feita uma incubação inespecífica entre anticorpos e proteínas recombinantes. A esse grupo deu-se o nome de “reconhecimento inespecífico”

Para o Anti-TnIc utilizou-se CK-MB no reconhecimento inespecífico e para o Anti-CKMB a proteína TnIc. Analisando os voltamogramas dos gráficos ainda da figura 20, pode-se observar que os valores de picos de corrente de redução, onde há maior diferenciação entre os grupos, possuem valores muito próximos (CKMB: negativo: -110 μ A, específico: -146 μ A, inespecífico: -185 μ A e TnIc: negativo: -112 μ A, específico: -130 μ A, inespecífico: -183 μ A). Também não foi observado um deslocamento no valor do potencial entre os grupos, o que poderia colaborar para uma análise diferencial entre os dois marcadores.

Figura 20. Voltamograma cíclico para o teste sanduíche



Voltamograma para o ferricianeto/ferrocianeto 5mM em KCl 100mM. Em (A) o reconhecimento específico para CK-MB e em (B) o reconhecimento específico para TnIc.

Embora a proximidade de valores faça com que a especificidade do teste diminua, esse problema poderia ser corrigido por meio de lógica de desenvolvimento de um software para interpretação do resultado. Considerando um dispositivo com detecção múltipla, os locais de fixação dos anticorpos de reconhecimento são previamente conhecidos. E, como há diferença significativa entre reconhecimento específico e inespecífico, esse problema poderia ser controlado. Mais testes são necessários para avaliar o limite de detecção dessa estratégia e para melhorar o reconhecimento cruzado, um problema já relatado em sistemas que utilizam o reconhecimento do tipo antígeno-anticorpo (GARG *et al.*, 2017; UPASHAM *et al.*, 2018).

Algumas outras condições que não o IAM, como sepse, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, contusão miocárdica, dentre outras, estão relacionadas com lesões em tecido cardíaco suficientes para aumentar níveis séricos de marcadores como as Tnc (VAZ *et al.*, 2019).

No caso de lesão miocárdica por contusão em pacientes com trauma torácico fechado, a inexistência de sinais e sintomas específicos dificultam o diagnóstico. A presença de TnIc e TnTc prolongada (maior que 36 horas) e em quantidades maiores ou iguais a 2ng. mL^{-1} foi suficiente para associar à presença de trauma torácico. Em casos como esses, onde apenas a presença do marcador associado ao histórico clínico do paciente é suficiente para a tomada de decisão, testes qualitativos tem aplicação em ambientes clínicos. Podem ser aplicáveis em ambientes onde o custo efetivo do exame tem relevância e nas tomadas de decisões necessárias em curto espaço de tempo (VAZ *et al.*, 2019; AHMED *et al.*, 2020)

Em se tratando da CK-MB condições como miocardite, miosite, cirurgias cardíacas e distrofias musculares, lesões musculares diversas, dentre outras, levam a um aumento dessa enzima em níveis plasmáticos (DASGUPTA & WAHED, 2014).

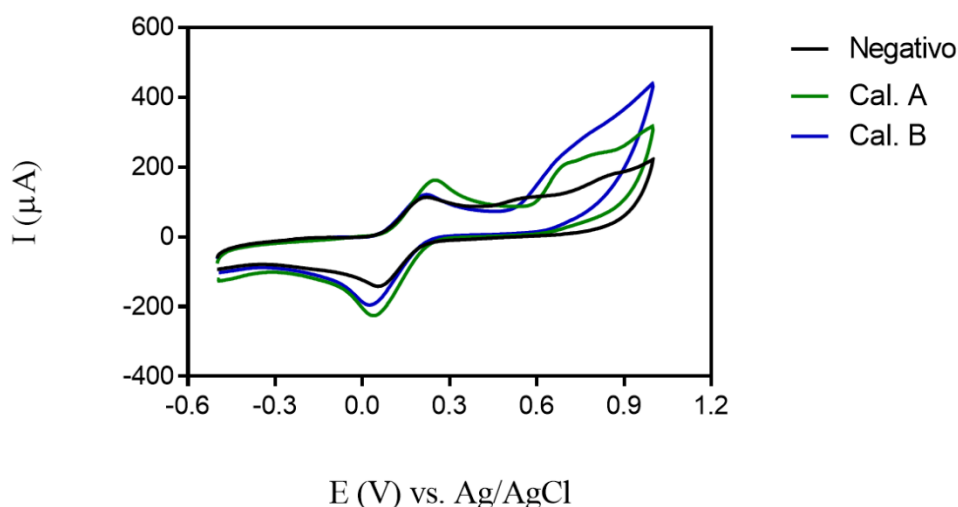
A proposta de um teste com detecção múltipla para esses dois marcadores, ainda que de maneira qualitativa, é uma alternativa para diagnósticos rápidos de exclusão, uma vez que as condições clínicas que interferem nos resultados para cada marcador são diferentes entre eles, podendo ser uma ferramenta auxiliar.

4.3.4 Detecção direta

Uma vez que foi possível detectar os biomarcadores desejados com o teste do tipo sanduíche, buscou-se utilizar essa estratégia com amostras reais, nesse caso, os calibradores. Porém, durante os testes, o soro negativo e as amostras dos calibradores (Cal. A e Cal. B) apresentaram comportamento eletroquímicos característico e individualizado, mesmo sem um agente para reconhecimento. Esse dado pode ser observado nos voltamogramas da figura 21, no potencial de 0,25 V há diferença entre o soro negativo e o Cal. A e no potencial 1,0 V há diferença entre as três amostras.

Isso remete à ideia de que as amostras possuem constituintes diferentes o suficiente para serem observados no estudo eletroquímico. Mais estudos são necessários para afirmar a maneira pela qual ocorre a interação com a superfície do eletrodo modificado e quais componentes estão de fato interagindo. Cabe aqui avaliações futuras comparando com biossensores chamados de terceira geração, que são aqueles baseados na transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo na ausência de mediadores (PILAR *et al.*, 2002). Nesse caso, porém, sem a utilização de enzimas.

Figura 21. Gráficos da leitura das amostras de soro negativo e do calibrador

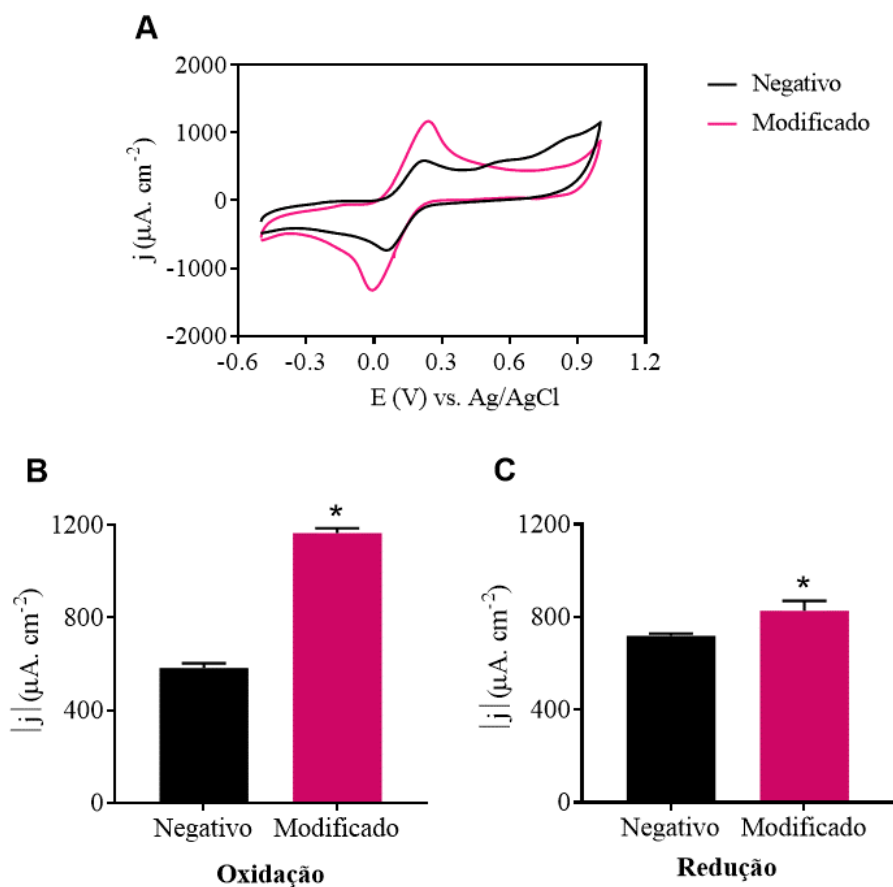


Voltamograma cíclico do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM em eletrodo com amostra negativa (linha contínua) e em eletrodo contendo o calibrador (linha pontilhada).

Uma forma encontrada de estudar o comportamento das amostras foi a avaliação da densidade de corrente gerada no eletrodo com as amostras, tanto negativo quanto calibradores. Esse valor é obtido quando tiramos a razão entre a corrente lida e a área ativa do eletrodo ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) (SHIN *et al.*, 2014).

Dentre as três amostras observadas, o soro negativo foi aquele que levou a um maior bloqueio se sinal de corrente, ainda na figura 21. Observando a figura 22, em uma análise por densidade de corrente (j) o soro negativo também bloqueou o sinal de corrente, tanto no pico de oxidação, quanto no pico de redução quando comparado com o eletrodo apenas modificado. Esse bloqueio associa-se a uma diminuição na densidade de corrente e menor área do eletrodo interagindo com a solução. O soro humano é composto por uma grande quantidade de proteínas, cerca de 6 a 8 g. dL⁻¹, das quais, 3,5 a 5,0 g. dL⁻¹ de albumina, e o restante, de globulinas (BUSHER *et al.*, 1990). A alta quantidade de proteína pode ser um dos motivos do comportamento observado.

Diante disso, da capacidade de reconhecimento de maneira diferencial entre as três amostras, os calibradores (Cal. A e Cal. B) foram usados em concentrações variáveis para o estudo do sinal do voltamograma e o bloqueio, ou não, de corrente, já que, quando puro, apresentaram uma diferença nos valores de pico em relação ao soro negativo.

Figura 22. Diminuição da área ativa em eletrodo com soro negativo

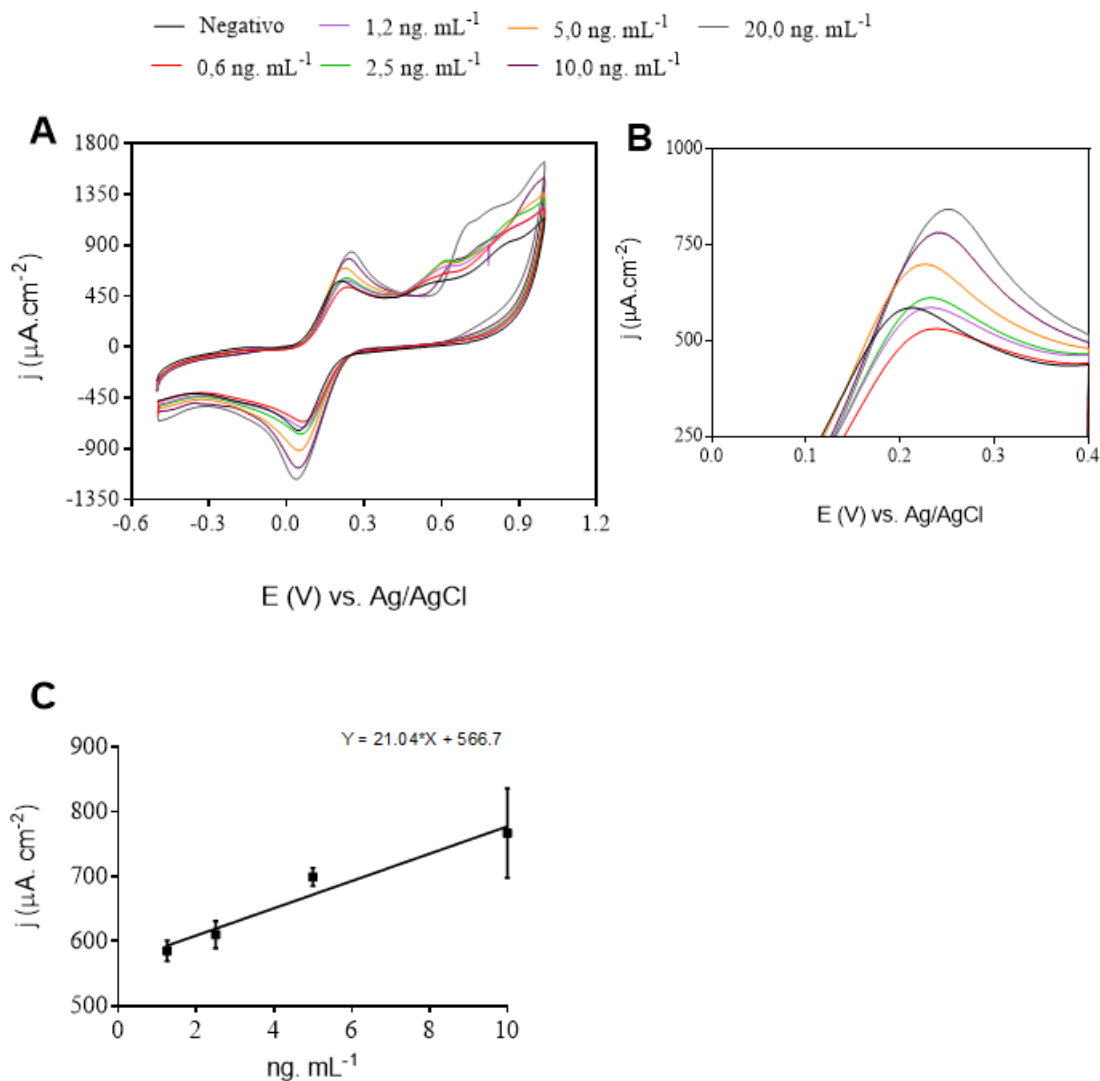
Em (A) o voltamograma cíclico do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM em eletrodo apenas modificado e em eletrodo com amostra negativa. (B) e (C) são gráficos de valores de corrente máxima para os dois eletrodos nos picos de oxidação e de redução, respectivamente.

A construção de uma curva com diferentes valores da proteína de interesse leva à possibilidade de desenvolvimento de um sensor qualitativo, e, nesse caso, capaz de diferenciar amostras contendo marcadores cardíacos daquelas que não possuem. De maneira geral, à medida que houve uma diminuição da concentração do analito e consequente aumento da proporção de soro negativo, observou-se que o comportamento da curva se alterou, tendendo para o sinal da amostra de negativo pura (figuras 23 e 24). Para o Cal. A, contendo concentrações conhecidas de Tnc, as curvas podem ser observadas na figura 23A.

Construiu-se uma curva de calibração para o sensor para determinar o seu limite de detecção para amostra contendo troponina cardíaca. Para isso, foram usados os valores de picos de oxidação em um potencial fixado (0,25 V), indicado na imagem em maior aumento na figura 23B. Os valores do pico de redução foram plotados em módulo em uma reta e uma análise por regressão linear nos levou a um r^2 de 0.94

para um intervalo de detecção entre 1,0 a 10,0 ng. mL⁻¹ (figura 23C), embora o ponto 0.6 e pontos com concentração menor devam ser feitos e/ou refeitos para melhorar a sensibilidade do limite inferior de detecção.

Figura 23 construção da curva de calibração para obtenção do intervalo de detecção para Tnc.



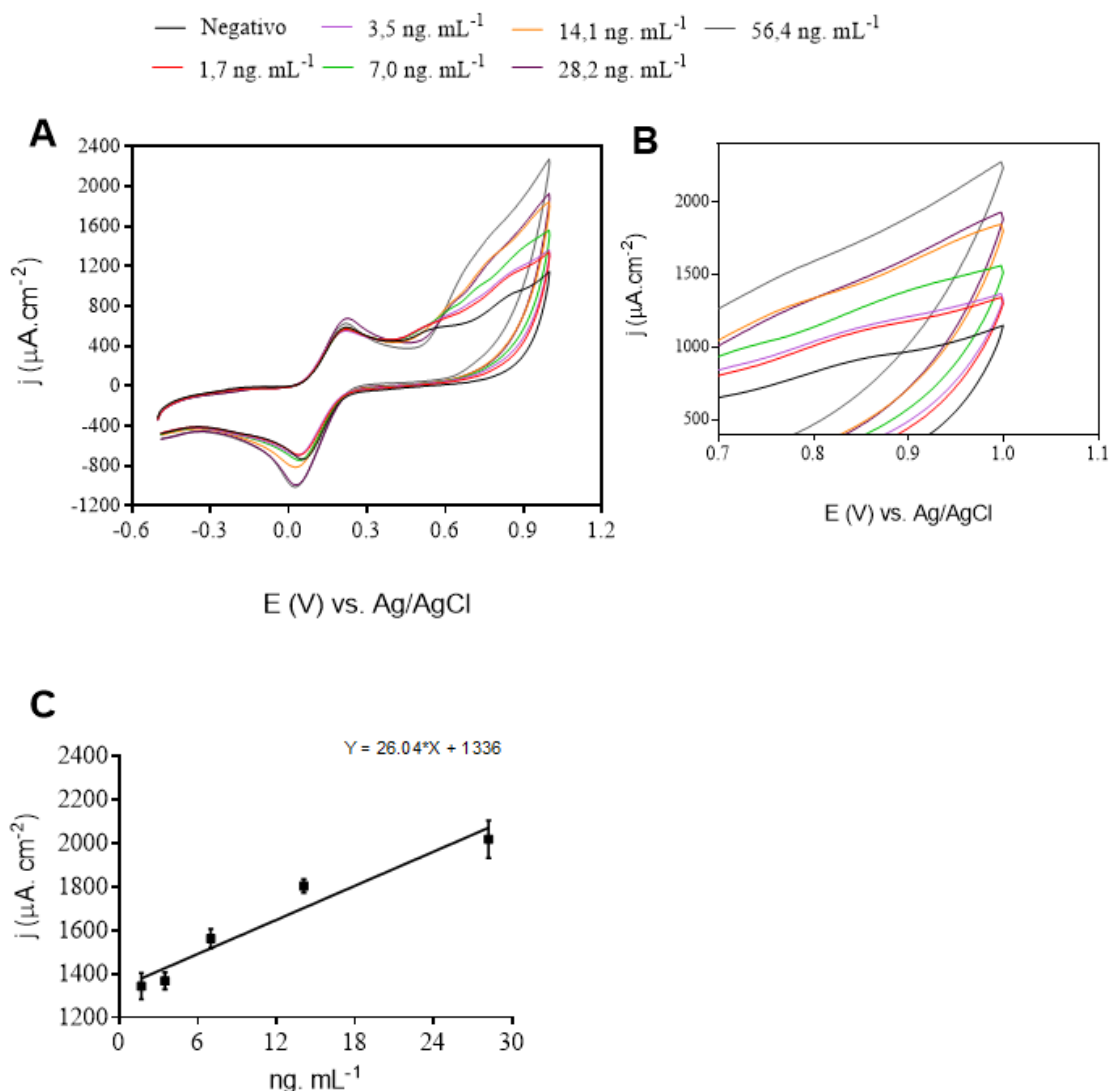
Em (A) o voltamograma cíclico do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM nas diferentes concentrações utilizadas e em (B) os picos de oxidação em maior aumento. Em (C) a reta obtida a partir dos valores de pico de corrente de oxidação.

As curvas para o Cal. B, contendo concentrações conhecidas de CK-MB, podem ser observadas na figura 24A. Assim como para o marcador anterior, foi construída uma curva de calibração para identificar o intervalo de detecção do teste.

Os valores de pico de oxidação no potencial 1,0 V (Figura 24B) foram plotados em uma reta e através de análise estatística por regressão linear obteve-se a equação

da reta um r^2 de 0,95. Dados mostrados na figura 24C. Para CK-MB o intervalo de detecção foi de 1,7 a 28 ng. mL⁻¹.

Figura 24 Construção da curva de calibração para obtenção do intervalo de detecção de CK-MB



Em (A) o voltamograma cíclico do ferricianeto/ ferrocianeto 5mM em KCl 100mM nas diferentes concentrações utilizadas e em (B) os picos de oxidação em maior aumento. Em (C) a reta obtida a partir dos valores de pico de corrente de oxidação.

Adotando medidas de densidade de corrente, buscou-se corrigir interferências que poderiam surgir em medidas em campo e em sistemas que utilizem eletrodos com área de trabalho diferente daquela utilizada neste trabalho.

Os resultados obtidos permitem o desenvolvimento de um sensor com potencial para diferenciar amostras apenas com proteínas séricas daquelas com adição de troponinas cardíacas, ou CK-MB. Como não há reconhecimento por meio de uma sonda específica, vale ressaltar que algumas condições como doenças inflamatórias,

neoplasias, desnutrição e doenças infecciosas, também podem elevar níveis de proteínas no soro (hiperproteinemia) (MOLINA *et al.*, 2002; ABDOLAH *et al.*, 2018; FUKUNAGA *et al.*, 2018). Os marcadores de IAM são proteínas que estão aumentadas no soro, porém pertencem a classes proteicas diferentes daquelas encontradas normalmente (KRAUSE *et al.*, 1996; DE BUYZERE & GRUSON, 2015).

Para avaliar o diagnóstico diferencial da presença de marcadores cardíacos e outras condições com hiperproteinemia, foram incluídas no grupo de pacientes negativos amostras de soro de paciente com histórico de DCV e de paciente com histórico de doença infecciosa recente. Amostras de pacientes com diagnóstico confirmado para IAM e amostras negativas foram lidas e comparadas entre si

As amostras foram então analisadas e os valores de corrente para o pico de oxidação, respectivos para cada marcador, foram utilizados para discriminar amostras positivas de amostras negativas. Esse critério foi capaz de diferenciá-las, tendo sido o parâmetro adotado para o marcador Tnc mais eficiente (figura 25).

Os marcadores cardíacos são uma das características avaliadas em pacientes com dor torácica e SCA, tendo a Tnc uma relevância particular nesse diagnóstico por características já citadas (WRIGHT *et al.*, 2011). A partir disso e da observação de que o critério para Tnc foi mais eficiente para diferenciar as amostras, as amostras positivas foram classificadas com relação ao grau de lesão miocárdica considerando a quantificação prévia de TnTc dessas amostras.

Figura 25 Diferenciação entre amostras positivas e negativas para IAM adotando parâmetros para dois marcadores diferentes

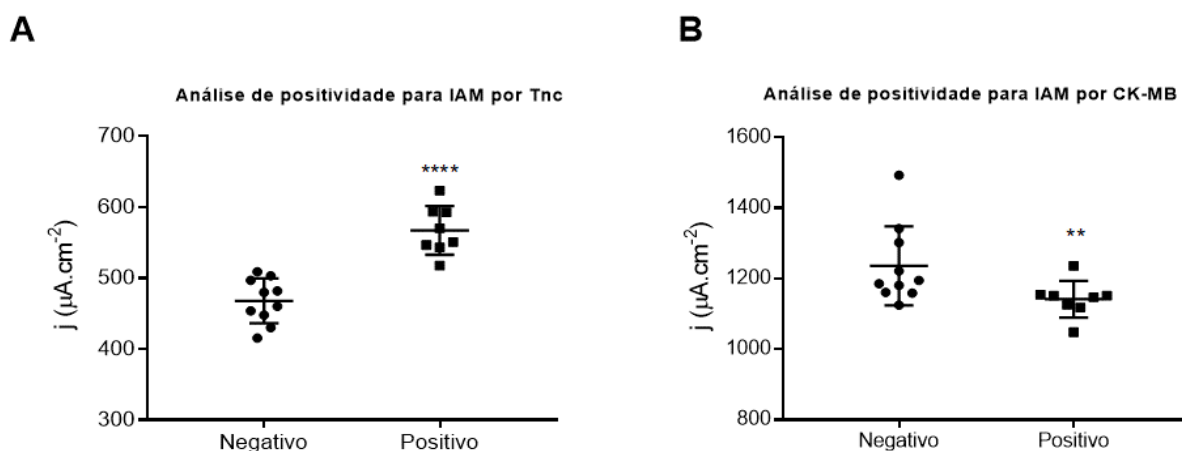


Gráfico de distribuição de amostras positivas e negativas diferenciadas por dois parâmetros diferentes. Em (A) adotou-se o potencial 0,2 V, da Tnc para diferenciar as amostras e em (B) adotou-se o potencial 1,0 V, de CK-MB.

Uma análise para verificar a acurácia dos testes e os modelos aqui proposto para separação dos grupos positivos e negativos mostrou valores de sensibilidade e especificidade de acordo com o mostrado na tabela 6. Embora o número de amostras tenha sido reduzido os testes apresentaram bons resultados. Com melhor sensibilidades e especificidade adotando os parâmetros para Tnc.

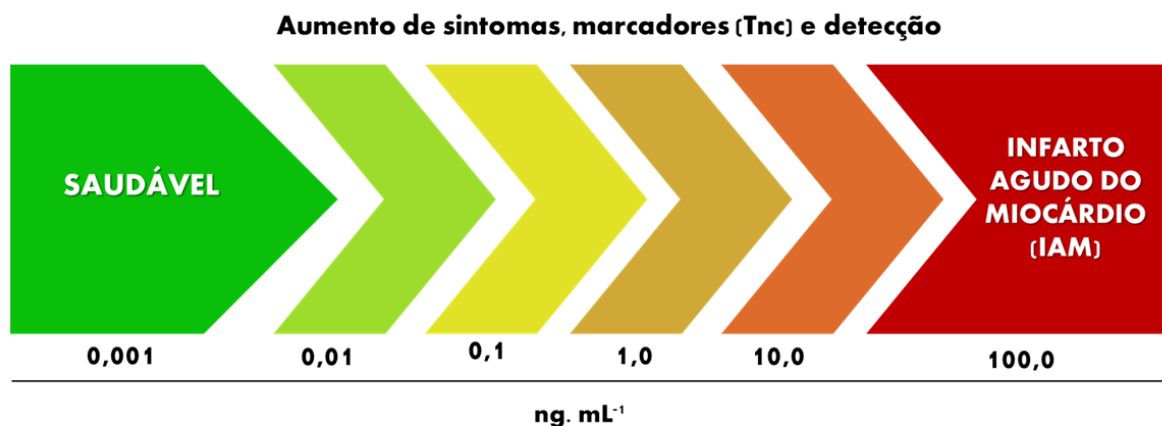
Valores plasmáticos em torno de $0,001 \text{ ng. mL}^{-1}$ de Tnc estão associados a indivíduos saudáveis, sem ocorrência de lesão em tecido cardíaco. Com relação ao limite que define se há ou não lesão cardíaca não há um consenso, para GARG *et al.* (2017) valores em torno de $0,01 \text{ ng. mL}^{-1}$ já seriam suficientes para indicar lesão, enquanto para FATHIL *et al.* (2015) esse evento ocorre com valores acima de $0,1 \text{ ng. mL}^{-1}$.

Tabela 6. Teste de curva ROC para separação entre grupos positivos e negativos Avaliação de acurácia do teste.

	Tnc	CKMB
Sensibilidade	100,0 %	87,6%
Especificidade	100,0 %	90,0%
<i>Cut-off</i>	503,2 $\mu\text{A. cm}^{-2}$	1157,0 $\mu\text{A. cm}^{-2}$

A presença e aumento de Tnc a níveis detectáveis segue uma evolução como mostrado na figura 26 e estão associados a condições clínicas que não necessariamente ao IAM. Concentrações tão baixas quanto $0,01 \text{ ng. mL}^{-1}$ estão relacionados a pacientes com angina estável, doenças cardíacas subclínicas e idade, por exemplo. Paciente com IAM de extensões micrométricas, ou leves, miocardite e insuficiência cardíaca aguda (ICA) podem apresentar níveis em torno de $0,1 \text{ ng. mL}^{-1}$. Crises hipertensivas, miocardites e IAM em uma região moderada levam a índices séricos de Tnc em torno de $1,0 \text{ ng. mL}^{-1}$. Enquanto valores acima de 10 ng. mL^{-1} indicam miocardite grave e IAM que acometem regiões médias a grandes do tecido cardíaco (FATHIL *et al.*, 2015; GARG *et al.*, 2017; TWERENBOLD *et al.*, 2017; VAZ *et al.*, 2019).

Figura 26. Progressão dos níveis de Tnc



Fonte: Adaptado de: FATHIL et al., 2015; GARG et al., 2017; VAZ et al., 2019. Esquema representativo do sentido de crescimento dos níveis de Tnc, sintomas de IAM como dor torácica e a capacidade de detecção de testes diagnósticos sua associação com o IAM.

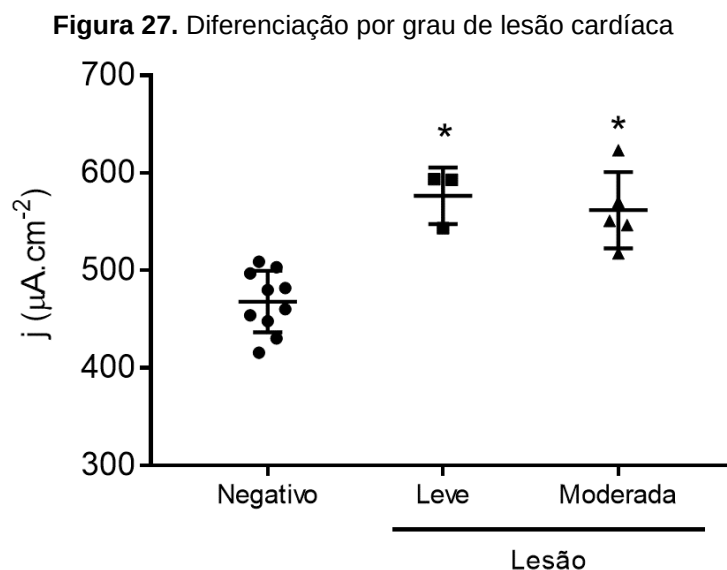
Há no mercado diferentes testes para detecção de Tnc com variados limites de detecção, variando desde 0,08 ng. mL⁻¹ para o teste i-STAT da empresa Abbott Point of care® até 0,01 ng. mL⁻¹ da empresa suíça Roche®. O valor limite para dizer se a quantidade encontrada é um indicativo de IAM é estabelecido pelo fabricante (UPASHAM et al., 2018).

Limites de detecção tão baixos levantam o questionamento sobre a eficiência de testes com alta sensibilidade, uma vez que, como já mencionado, existem outras condições que podem levar a um aumento de Tnc (VAZ et al., 2019). Foi o que mostrou um estudo feito por MARIATHAS et al. (2019) em que 1 em cada 20 pacientes do hospital, que coletaram amostra de sangue por motivos diversos, apresentou um teste para TnIc de alta sensibilidade com valores acima do limite de normalidade determinado pelo fabricante, mostrando a necessidade de associação dos resultados com as características clínicas do paciente.

As amostras classificadas com relação ao grau da lesão, considerando dados da literatura citados acima, foram comparadas ao grupo de amostras negativas. A plataforma foi capaz de diferenciar os dois grupos positivos de maneira individual, mas não entre si (figura 27). Foram consideradas lesões leves aquelas que tiveram quantificação de Tnc no intervalo de 0,01 a 0,1 ng. mL⁻¹ e moderada, amostras com quantidades entre 0,1 e 1,0 ng. mL⁻¹. Como forma de quantificação, os dados de corrente foram substituídos na curva de calibração obtida e os valores comparados

Agrupamento das amostras por lesão cardíaca comparadas com amostras negativas.

com os resultados prévios. Não houve correlação entre os valores (dados não mostrados).



O biossensor aqui proposto não utiliza sonda e, portanto, não possui um reconhecimento para uma molécula específica, por esse motivo a substituição dos valores pode não ter sido eficiente. Enquanto a classificação por perfis, levando em consideração todos os componentes da amostra, teve mais sucesso na separação dos grupos.

Uma vez que os marcadores cardíacos são liberados na corrente sanguínea, estão suscetíveis a modificações pós traducionais como fosforilação e ubiquitinação, além da formação de complexos proteicos. Além disso, essas proteínas são degradadas com o tempo. Essas alterações sofridas por essas proteínas prejudicam análises que buscam a identificação do marcador em sua forma nativa, como aquelas que usam anticorpo para detecção. (ZHANG *et al.*, 2011; STRENG *et al.*, 2013; STRENG, 2017).

A condição em que o marcador se encontra na corrente sanguínea é fundamental para elaborar um teste diagnóstico que seja eficiente no seu reconhecimento, esse também pode ter sido um dos motivos da dificuldade encontrada para se utilizar proteínas recombinantes e a divergência dos resultados para quantidades iguais de proteína (STRENG *et al.*, 2017; VAN DER LINDEN *et al.*, 2017).

A técnica de diagnóstico de IAM sem a utilização de marcadores já foi proposta anteriormente por meio de sensores óticos para detecção. Nesse tipo de análise, é avaliado o perfil gráfico como um todo da amostra, diante da excitação por um

determinado comprimento de onda. Por análise multivariada (CHEN *et al.*, 2016) conseguiu diferenciar amostras de soro de pacientes positivos e negativos para IAM.

Antes disso, NISHIKI-MURANISHI *et al.* (2014) analisou tecido cardíaco em modelos murinos e conseguiu discriminar a presença de alterações celulares como necrose, granulação e tecido fibroso com a técnica de microscopia RAMAN associada à análise multivariada dos dados. A detecção foi associada à presença de compostos diferentes causados pelas lesões citadas. Sabendo que o IAM é causa lesões no tecido cardíaco, analisar o perfil da amostra como um todo se torna válido uma vez que há alterações morfológicas com produtos que podem ser detectados (YAMAMOTO *et al.*, 2018).

Corroborando com a liberação sistêmica de compostos característicos, não só de proteínas marcadores como já mencionado, mas um perfil de resposta, CAO *et al.* (2015) diferenciou amostras de pacientes positivos e negativos analisando saliva também pela metodologia de RAMAN. HAAS *et al.* (2010) usando o mesmo tipo de amostra identificou IAM a FTIR, outra metodologia baseada em detecção ótica.

Usar o perfil de componentes totais de amostras de pacientes com IAM ou outras leva à possibilidade de desenvolvimento de um sensor capaz de diferenciar intensidades de lesões de IAM, demonstrado como prova de conceito neste trabalho, entre si e de outros quadros clínicos que causam danos em cardiomiócitos, aumentando o nível plasmático de marcadores. Enquanto os testes de Tnc de alta sensibilidade são eficientes na detecção precoce de IAM, um sensor para o quadro como um todo tem uma aplicação mais ampla na clínica, não se restringindo apenas a casos de urgência em cardiologia, mas para acompanhamento de pacientes hospitalizados e com comorbidades crônicas associadas.

Embora limitada, a forma de detecção proposta neste trabalho foi capaz de detectar a positividade para IAM com diferentes graus de lesão tecidual. Apesar da limitação ser um ponto negativo quando comparado com os testes de Tnc de alta sensibilidade, uma vantagem é a não reação cruzada com outras condições que podem afetar o resultado e a possibilidade de aplicação em outras situações que a proposta inicialmente.

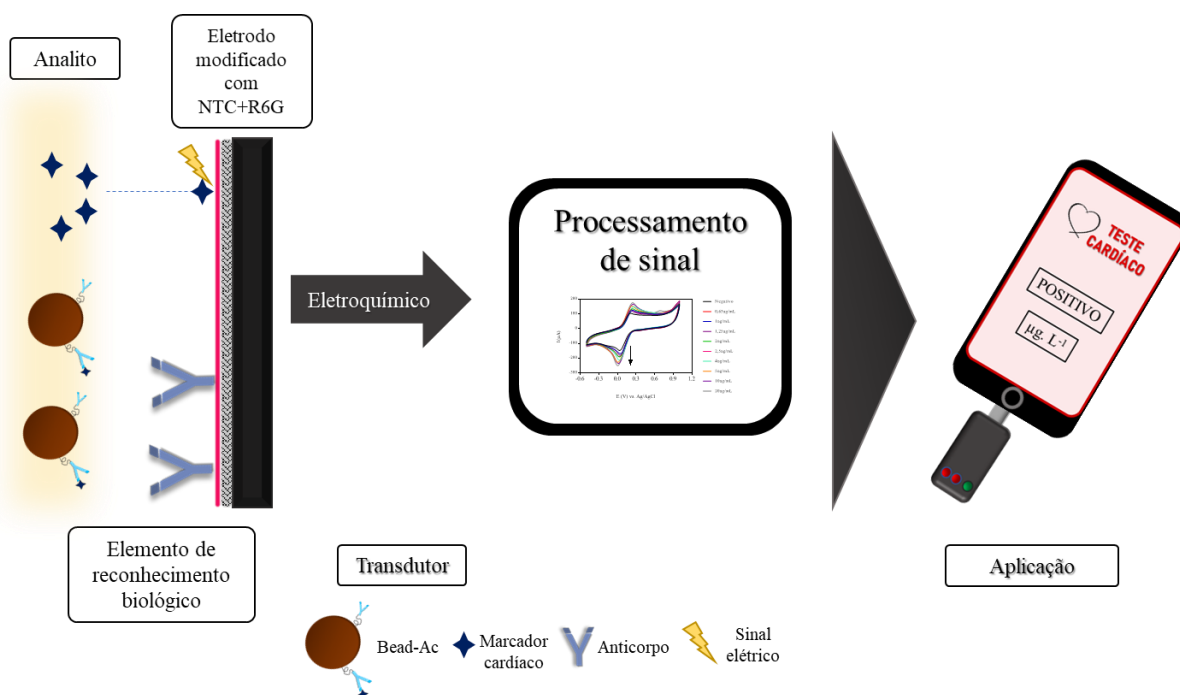
Mais testes são necessários para explorar os diferentes graus de IAM e sua diferença com comorbidades que levam a alterações em marcadores cardíacos. Para caracterizar os perfis eletroquímicos para cada situação. A fim de aprimorar o biossensor aqui desenvolvido foi submetido um projeto ao Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP) da Universidade para coletar amostras de pacientes com IAM diagnosticado e de pacientes com histórico de comorbidades que possam interferir no resultado. Como não há reconhecimento por anticorpo, não há um sensor diagnóstico de marcadores específicos, mas de um possível perfil de marcadores característicos do quadro de IAM. Para isso, é preciso testar amostras reais de pacientes para validação da plataforma desenvolvida.

5. CONCLUSÃO

- Matrizes poliméricas enriquecidas com NTC associadas à R6G são uma forma eficiente de estabilizar e modificar a superfície de eletrodos *screen-printed*;
- A modificação foi eficiente ao permitir adsorção de componentes biológicos e nanomaterias na superfície de trabalho;
- A estratégia do tipo sanduíche foi capaz de diferenciar amostras positivas de negativas de maneira específica;
- A detecção direta usando amostras de soro diferenciou amostras positivas de amostras negativas e conseguiu identificar marcadores de maneira concentração-dependente;
- As análises usando densidade de corrente foram eficientes e permitem que os testes sejam transportados para diferentes plataformas que não as utilizadas neste trabalho;
- O biossensor modificado tem potencial para desenvolver uma plataforma para detectar diferentes perfis dentro do quadro de IAM;

Figura 28. Ilustração de resumo dos dados apresentados e de perspectivas futuras



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

6. REFERÊNCIAS

- ABDOLAH, M. *et al.* A Novel Combination of omega-3 Fatty Acids and Nano-Curcumin Modulates Interleukin-6 Gene Expression and High Sensitivity C-reactive Protein Serum Levels in Patients with Migraine: A Randomized Clinical Trial Study. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 17, n. 6, p. 430-438, 2018. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180625101643>
- AHMED, S. A. *et al.* Sensitivity and Specificity of Bedside Qualitative Troponin I Test Kit as Compared with the Standardized Quantitative Lab Test for Troponin I. **Cureus**. v. 12, n. 5, p. e8201, 2020. <https://doi.org/10.7759/cureus.8201>
- APPLE, F. S. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. **Clin Chim Acta**. v. 284, n. 2, p. 151-9, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00077-7)
- ARREDONDO, Michelle *et al.* Some clinical applications of the electrochemical biosensors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 14, 2012. <https://doi.org/10.2174/138955712802762031>
- AYDIN, S. *et al.* Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. **Vasc Health Risk Manag**. v. 15, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S166157>
- BANICA, Florinel-Gabriel. Affinity-Based Recognition. *In: Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*: ed., v., 2012a.
- BANICA, Florinel-Gabriel. Nanomaterial applications in chemical sensors. *In: Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*: ed., v., 2012b. <https://doi.org/10.1002/9781118354162>
- BIGNAMI, E. *et al.* Role of cardiac biomarkers (troponin I and CK-MB) as predictors of quality of life and long-term outcome after cardiac surgery. **Ann Card Anaesth**. v. 12, n. 1, p. 22-6, 2009. <https://doi.org/10.4103/0971-9784.45009>
- BUSHER, J. T. *et al.* Serum Albumin and Globulin. *In: Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*: ed. Boston, v., 1990.
- CAI, Bingjie *et al.* Ultrasensitive label-free detection of PNA-DNA hybridization by reduced graphene oxide field effect transistor biosensor. **ACS Nano**. v. 8, n. 3, p. 7, 2014. <https://doi.org/10.1021/nn4063424>
- CAO, Gang *et al.* A potential method for non-invasive acute myocardial infarction detection based on saliva Raman spectroscopy and multivariate analysis. **Laser Physics Letters**. v. 12, n. 12, 2015. <https://doi.org/10.1088/1612-2011/12/12/125702>
- CARLOMAGNO, C. *et al.* Human salivary Raman fingerprint as biomarker for the diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Scientific Reports**. v. 10, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67138-8>

CHACKO, S. *et al.* The role of biomarkers in the diagnosis and risk stratification of acute coronary syndrome. **Future Sci OA**. v. 4, n. 1, p. FSO251, 2018. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0036>

CHAUBEY, Asha; MALHOTRA, B D. Mediated biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 17, p. 15, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X)

CHEN, Changzhong *et al.* Morphology and performances of electrospun polyethylene glycol/poly (dl-lactide) phase change ultrafine fibers for thermal energy storage. **Solar Energy Materials and Solar Cells**. v. 117, p. 372-381, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2013.07.001>

CHEN, Y. X. *et al.* Label-Free Optical Detection of Acute Myocardial Infarction Based on Blood Plasma Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Journal of Applied Spectroscopy**. v. 83, n. 5, p. 798-804, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10812-016-0366-2>

CLARK, L. C., Jr.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann N Y Acad Sci**. v. 102, p. 29-45, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

CRUZ, Felipe Soares. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos utilizando eletrodos impressos de grafite modificados com poli ácido 4 aminobenzóico aplicados ao diagnóstico de zika vírus**. 2018. 92 p. (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018.

DANAFAR, H. *et al.* PLA-PEG-PLA copolymer-based polymersomes as nanocarriers for delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs: preparation and evaluation with atorvastatin and lisinopril. **Drug Dev Ind Pharm**. v. 40, n. 10, p. 1411-20, 2014. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.828223>

DANAFAR, H. *et al.* Drug-conjugated PLA-PEG-PLA copolymers: a novel approach for controlled delivery of hydrophilic drugs by micelle formation. **Pharm Dev Technol**. v. 22, n. 8, p. 947-957, 2017. <https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1125920>

DASGUPTA, Amitava; WAHED, Amer. Cardiac Markers. *In: Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*: ed., v. p.127-144, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407821-5.00008-5>

DAUM, N. *et al.* Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: effects of particle design and shape. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**. v. 4, n. 1, p. 52-65, 2012. <https://doi.org/10.1002/wnan.165>

DE BUYZERE, M.; GRUSON, D. Biomarkers in heart failure. **Clin Chim Acta**. v. 443, p. 1-2, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.015>

DE MARCELLIS, Andrea; FERRI, Giuseppe. Physycal and Chemical Sensors. *In: Analog Circuits and Systems for Voltage-Mode and Current-Mode Sensor Interfacing Applications* ed., v., 2011.

DRACUP, K. *et al.* Causes of delay in seeking treatment for heart attack symptoms. **Soc Sci Med.** v. 40, n. 3, p. 379-92, 1995. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(94\)00278-2](https://doi.org/10.1016/0277-9536(94)00278-2)

FATHIL, M. F. *et al.* Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. **Biosens Bioelectron.** v. 70, p. 209-20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.037>

FERNANDES, Julio Cesar Bastos; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Eletrodos ions seletivos: histórico, mecanismos de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química nova.** v. 24, n. 1, p. 11, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100020>

FERREIRA, Kaline Nascimento. **ESTUDO DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SINVASTATINA UTILIZANDO NANOFIBRAS DE PLA/PEG PRODUZIDAS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO.** 2017. 90 p. (Mestrado). Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2017.

FREIRE, Renato S *et al.* Direct electron transfer between and approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 14, n. 2, p. 14, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200008>

FUKUNAGA, S. *et al.* Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. **Int J Mol Med.** v. 41, n. 1, p. 107-118, 2018.

GANDRA, Paulo Guimarães *et al.* Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química nova.** v. 27, n. 6, p. 6, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600024>

GARG, P. *et al.* Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. **Intern Emerg Med.** v. 12, n. 2, p. 147-155, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11739-017-1612-1>

GORTON, L *et al.* Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. **Analytica Chimica Acta.** v. 400, p. 18, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00610-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00610-8)

GRIESHABER, D. *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel).** v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

HAAS, S. L. *et al.* Spectroscopic diagnosis of myocardial infarction and heart failure by Fourier transform infrared spectroscopy in serum samples. **Appl Spectrosc.** v. 64, n. 3, p. 262-7, 2010. <https://doi.org/10.1366/000370210790918508>

HILDEBRANT, Peter; STOCKBURGER, Manfred. Surface Enhanced Resonance raman spectroscopy of rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. **Journal of Physical Chemistry.** v. 88, p. 12, 1984. <https://doi.org/10.1021/j150668a038>

HOELLER, R. *et al.* Normal presenting levels of high-sensitivity troponin and myocardial infarction. **Heart**. v. 99, n. 21, p. 1567-72, 2013. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-303643>

HORIKAWA, S. *et al.* Effects of surface functionalization on the surface phage coverage and the subsequent performance of phage-immobilized magnetoelastic biosensors. **Biosens Bioelectron**. v. 26, n. 5, p. 2361-7, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.10.012>

HULANICKI, Adam; GLAB, Stanislaaw; INGMAN, Folke. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**. v. 63, n. 9, p. 4, 1991. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>

KOYUN, Ahmet; AHLATCOLU, Esma; KOCA, Yeliz. Biosensors and Their Principles. *In: A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*: ed., v. cap. Chapter 4, 2012. <https://doi.org/10.5772/48824>

KRAUSE, Ernest-Georg *et al.* Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 160, p. 7, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00240061>

LEE, Hyeong Yun *et al.* An electrochemical biosensor based on a myoglobin-specific binding peptide for early diagnosis of acute myocardial infarction. **Analytical Sciences**. v. 31, p. 5, 2015. <https://doi.org/10.2116/analsci.31.699>

LIM, W. Y. *et al.* Paper microfluidic device for early diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction via quantitative multiplex cardiac biomarker detection. **Biosens Bioelectron**. v. 128, p. 176-185, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.049>

MARCUS, R. A. On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. **J Chem Phys**. v. 24, n. 5, p. 14, 1956. <https://doi.org/10.1063/1.1742723>

MARIATHAS, M. *et al.* True 99th centile of high sensitivity cardiac troponin for hospital patients: prospective, observational cohort study. **BMJ**. v. 364, p. l729, 2019. <https://doi.org/10.1136/bmj.l729>

MEDEIROS, Eliton S. *et al.* Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 113, n. 4, p. 2322-2330, 2009. <https://doi.org/10.1002/app.30275>

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **J Oral Biol Craniofac Res**. v. 6, n. 2, p. 153-9, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Anal Sci**. v. 20, n. 8, p. 1113-26, 2004. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>

METKAR, Sanjay Kisan; GIRIGOSWAMI, Koyeli. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 17, p. 271-283, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.029>

MOLINA, R. *et al.* S-100 protein serum levels in patients with benign and malignant diseases: false-positive results related to liver and renal function. **Tumour Biol.** v. 23, n. 1, p. 39-44, 2002. <https://doi.org/10.1159/000048687>

MYTHILI, S.; MALATHI, N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction. **Biomed Rep.** v. 3, n. 6, p. 743-748, 2015. <https://doi.org/10.3892/br.2015.500>

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. **Anal Bioanal Chem.** v. 377, n. 3, p. 446-68, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1947-5>

NGAMCHUEA, Kamonwad *et al.* Planar diffusion to macro disc electrodes—what electrode size is required for the Cottrell and Randles-Sevcik equations to apply quantitatively? **Journal of Solid State Electrochemistry.** v. 18, n. 12, p. 3251-3257, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10008-014-2664-z>

NISHIKI-MURANISHI, N. *et al.* Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy. **Anal Chem.** v. 86, n. 14, p. 6903-10, 2014. <https://doi.org/10.1021/ac500592y>

OLIVEIRA, Juliano E. *et al.* Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. **Advances in Materials Science and Engineering.** v. 2013, p. 1-14, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/409572>

OUIS, Mekhaissia *et al.* Electro-polymerization of pyrrole on graphite electrode: enhancement of electron transfer in bioanode of microbial fuel cell. **Polymer Bulletin.** v. 75, n. 2, p. 669-684, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2048-5>

PACHECO, W. F. *et al.* Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química.** v. 5, n. 4, 2013. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Biosensor Technology: A Brief History. *In: Sensors and Microsystems:* ed., v. cap. Chapter 2, p.15-23, 2010. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3606-3_2

PARNELL, C. M. *et al.* Simultaneous Electrochemical Deposition of Cobalt Complex and Poly(pyrrole) Thin Films for Supercapacitor Electrodes. **Sci Rep.** v. 9, n. 1, p. 5650, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41969-6>

PAROLO, C.; MERKOCI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chem Soc Rev.** v. 42, n. 2, p. 450-7, 2013. <https://doi.org/10.1039/C2CS35255A>

PILAR, Maria del Pilar; SOTOMAR, Taboada ; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química nova.** v. 25, n. 1, p. 6, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000100021>

POURGHOBADI, Roghiyeh *et al.* Electropolymerization of catechol on wireless graphite electrode. Unusual cathodic polycatechol formation. **Journal of Electroanalytical Chemistry.** v. 866, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114180>

PRAJAPATI, Shiv Kumar *et al.* Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. **European Polymer Journal**. v. 120, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>

RESTREPO, Iván *et al.* The effect of molecular weight and hydrolysis degree of poly(vinyl alcohol)(PVA) on the thermal and mechanical properties of poly(lactic acid)/PVA blends. **Polímeros**. v. 28, n. 2, p. 169-177, 2018. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03117>

RIELLO, Fabiane Nunes. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico funcionalizado com rodamina 6G para detecção de micobactérias**. 2019. 125 p. (Doutorado). Ciências da Saúde, Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

RODRIGUES, Ariano Giovanni; GALZERANI, José Cláudio. Espectroscopias de infravermelho, raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementariedades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 34, n. 4, p. 9, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1806-11172012000400009>

ROOYANIAN, S. *et al.* A simple route to surface functionalization of graphene nanosheets by benzoic acid and its application toward Pb(ii) sensing. **New Journal of Chemistry**. v. 42, n. 21, p. 17371-17378, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8NJ04110E>

SANATI, A. *et al.* A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. **Mikrochim Acta**. v. 186, n. 12, p. 773, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3854-2>

SCHIFF, G. D. *et al.* Decompensated heart failure: symptoms, patterns of onset, and contributing factors. **Am J Med**. v. 114, n. 8, p. 625-30, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(03\)00132-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(03)00132-3)

SHIN, Y. E. *et al.* An ice-templated, pH-tunable self-assembly route to hierarchically porous graphene nanoscroll networks. **Nanoscale**. v. 6, n. 16, p. 9734-41, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4NR01988A>

SOARES, Juliana Coatrini. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. 2011. p. (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

STRENG, A. S. **The path of life of cardiac troponin T proteomic analysis of circulating proteoforms**. 2017. p. Maastricht University, 2017.

STRENG, A. S. *et al.* Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. **J Mol Cell Cardiol**. v. 63, p. 47-56, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.07.004>

STRENG, A. S. *et al.* Identification and Characterization of Cardiac Troponin T Fragments in Serum of Patients Suffering from Acute Myocardial Infarction. **Clin Chem**. v. 63, n. 2, p. 563-572, 2017. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.261511>

STRIDH, M. *et al.* Characterization of atrial fibrillation using the surface ECG: time-dependent spectral properties. **IEEE Trans Biomed Eng.** v. 48, n. 1, p. 19-27, 2001. <https://doi.org/10.1109/10.900245>

TEIXEIRA, Ana Maria; BORGES, GRasiely F. Creatine Kinase: Structure and function. **Brazilian Journal of Biomotricity.** v. 6, n. 2, p. 12, 2012.

THÉVENOT, Daniel R. *et al.* Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. **Analytical Letters.** v. 34, n. 5, p. 635-659, 2007. <https://doi.org/10.1081/AL-100103209>

THYGESEN, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). **Circulation.** v. 138, n. 20, p. e618-e651, 2018. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>

TONCHEVA, A. *et al.* Antibacterial PLA/PEG electrospun fibers: Comparative study between grafting and blending PEG. **European Polymer Journal.** v. 75, p. 223-233, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.12.019>

TUNCAGIL, S. *et al.* Gold nanoparticle modified conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-yl) benzenamine for potential use as a biosensing material. **Food Chem.** v. 127, n. 3, p. 1317-22, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.089>

TWERENBOLD, R. *et al.* Clinical Use of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Patients With Suspected Myocardial Infarction. **J Am Coll Cardiol.** v. 70, n. 8, p. 996-1012, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.718>

UPASHAM, Sayali; TANAK, Ambalika; PRASAD, Shalini. Cardiac troponin biosensors: where are we now? **Advanced Health Care Technologies.** v. Volume 4, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.2147/AHCT.S138543>

VAN DER LINDEN, N. *et al.* Large Variation in Measured Cardiac Troponin T Concentrations after Standard Addition in Serum or Plasma of Different Individuals. **Clin Chem.** v. 63, n. 7, p. 1300-1302, 2017. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.272435>

VAZ, H. A.; GUIMARAES, R. B.; DUTRA, O. Challenges in high-sensitive troponin assay interpretation for intensive therapy. **Rev Bras Ter Intensiva.** v. 31, n. 1, p. 93-105, 2019. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190001>

WANG, J-H *et al.* The use of rhodamine 6G and fluorescence microscopy in the evaluation of phospholipid-based polymeric biomaterials. **Journal of Microscopy.** v. 217, p. 9, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01453.x>

WEBER, M. *et al.* Diagnostic utility of new immunoassays for the cardiac markers cTnI, myoglobin and CK-MB mass. **Clin Biochem.** v. 38, n. 11, p. 1027-30, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.07.011>

WHO. Cardiovascular Disease. 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1. Acesso em 06-15-2020.

WRIGHT, R. S. *et al.* 2011 ACCF/AHA focused update of the Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2007 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. **J Am Coll Cardiol.** v. 57, n. 19, p. 60, 2011.

XIE, Qingji *et al.* Electrochemical quartz crystal microbalance monitoring of the cyclic voltammetric deposition of polyaniline. **Journal of Chemical Education.** v. 84, n. 4, p. 4, 2007. <https://doi.org/10.1021/ed084p681>

YAMAMOTO, T. *et al.* Label-free Evaluation of Myocardial Infarct in Surgically Excised Ventricular Myocardium by Raman Spectroscopy. **Sci Rep.** v. 8, n. 1, p. 14671, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33025-6>

ZHANG, Z.; FENG, H. Z.; JIN, J. P. Structure of the NH₂-terminal variable region of cardiac troponin T determines its sensitivity to restrictive cleavage in pathophysiological adaptation. **Arch Biochem Biophys.** v. 515, n. 1-2, p. 37-45, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.08.013>

