



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDUARDO ZAPP

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES À BASE DE  
CRISTAIS LÍQUIDOS E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES CARDÍACOS**

Florianópolis - SC  
2014

EDUARDO ZAPP

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES À BASE DE  
CRISTAIS LÍQUIDOS E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES CARDÍACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis-SC

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zapp, Eduardo

Desenvolvimento de imunossensores à base de cristais líquidos e nanopartículas de ouro para detecção de biomarcadores cardíacos / Eduardo Zapp ; orientadora, Iolanda Cruz Vieira - Florianópolis, SC, 2014.  
125 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Imunossensor eletroquímico. 3. Cristal líquido. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Biomarcador cardíaco. I. Vieira, Iolanda Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

EDUARDO ZAPP

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES À BASE DE  
CRISTAIS LÍQUIDOS E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES CARDÍACOS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em  
Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 07 de Novembro de 2014.



Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**



Prof.ª Dr.ª Iolanda Cruz Vieira  
Orientadora (DQ/UFSC)



Prof. Dr. Mauro Bertotti (IQ/USP)



Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
(DQ/UFSC)



Prof.ª Dr.ª Hideko Yamanaka  
Relatora (IQ/UNESP-Araraquara)



Prof. Dr. Almir Spinelli  
(DQ/UFSC)



Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz  
(DQ/UFSC-Blumenau)

*Aos meus pais,  
Leonildo e Cirlene*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por tudo;

Aos meus pais, Leonildo e Cirlene, que são os meus maiores incentivadores e responsáveis pelas minhas conquistas;

À minha avó Madalena pelo constante apoio e incentivo;

À minha namorada Daniela pela ajuda, amor e constante companhia;

A toda minha família, por todo carinho e atenção;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante toda a minha formação e desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Hugo Gallardo, ao Dr. Eduard Westphal e ao Dr. Edivandro Giroto pela síntese e caracterização dos cristais líquidos, bem como as construtivas discussões a cerca do tema;

Ao Prof. Dr. Bernardo de Souza e ao Prof. Dr. Bruno Silveira de Souza pela síntese e caracterização das nanopartículas de ouro revestidas com polietilenoimina;

Ao Prof. Almir Spinelli e ao doutorando Paulo Sérgio da Silva pela colaboração com síntese e caracterização das nanopartículas de ouro e desenvolvimento do imunossensor para troponina T;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) pelas medidas de microscopia.

Ao Departamento de Física por ceder gentilmente o microscópio de luz polarizada para as caracterizações dos eletrodos;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação;

A todos os professores da banca examinadora por aceitarem fazer parte da mesma;

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) – pela amizade e importante ajuda sempre que precisei;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro.

## LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2012-2014)

- ❖ SILVA, T.R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I.C. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) for determination of vanillin. **Electroanalysis**, (*in press*).
- ❖ ZAPP, E.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SOUZA, B.; VIEIRA, I.C. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. **Biosens. Bioelectron.**, 59, 127–133, 2014.
- ❖ ZAPP, E.; SILVA, P.S.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C. Troponin T Immunosensor Based on Liquid Crystal and Silsesquioxane-Supported Gold Nanoparticles. **Bioconjugate Chem.**, 25, 1638–1643, 2014.
- ❖ ZAPP, E.; NASCIMENTO, V.; DAMBROWSKI, D.; BRAGA, A.L.; VIEIRA, I.C. Bio-inspired sensor based on glutathione peroxidase mimetic for hydrogen peroxide detection. **Sens. Actuators B**, 176, 782–788, 2013.
- ❖ ZAPP, E.; SOUZA, F.D.; SOUZA, B.S.; NOME, F.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C. A bio-inspired sensor based on surfactant film and Pd nanoparticles. **Analyst**, 138, 509–517, 2013.

## RESUMO

Este trabalho relata o desenvolvimento de três novos imunossensores eletroquímicos *label-free* construídos a partir de moléculas de cristais líquidos (CL) e nanopartículas de ouro (AuNP), para detecção de mioglobina (Mb), troponina T (cTnT) e troponina I (cTnI), que são importantes biomarcadores empregados no diagnóstico de doenças cardíacas, como o infarto agudo do miocárdio. O primeiro imunossensor apresentado foi construído a partir da combinação do CL iônico, brometo de (*E*)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio (Br-Py), como uma sonda redox, e AuNP estabilizadas em polietilenoimina. Essa plataforma foi empregada na imobilização covalente de anticorpos anti-Mb. Até onde sabemos esse foi um dos primeiros trabalhos publicados empregando moléculas de CL para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico. Esse imunossensor foi otimizado para a determinação de Mb a partir da inibição do sinal da sonda Br-Py, obtido por voltametria de onda quadrada. A faixa de trabalho obtida foi de 10 a 72,8 ng mL<sup>-1</sup> com um limite de detecção (LOD) de 6,3 ng mL<sup>-1</sup>. O segundo imunossensor foi construído empregando-se a mesma sonda redox Br-Py, que foi combinada com AuNP estabilizadas em silsesquioxano, matriz empregada para imobilização do anticorpo anti-cTnT por meio de interação eletrostática. Após otimização dos parâmetros de construção e operação obteve-se uma curva de calibração para cTnT. A faixa de trabalho obtida foi de 0,1 a 0,9 ng mL<sup>-1</sup> com um LOD de 0,08 ng mL<sup>-1</sup>. Já o terceiro imunossensor foi construído com uma molécula de CL colunar derivado de 1,3,4-oxadiazol e AuNP estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina, sendo esta plataforma empregada para imobilização covalente do anticorpo anti-cTnI. Os estudos de formação do imunocomplexo foram realizados empregado como sonda redox o par Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, usando a inibição do sinal voltamétrico, medido por voltametria linear, ou então o aumento da R<sub>ct</sub> por espectroscopia de impedância eletroquímica. Após otimização dos parâmetros de construção e operação obteve-se uma curva de calibração para cTnI com uma faixa de trabalho de 0,01 a 0,3 ng mL<sup>-1</sup> com um LOD de 0,005 ng mL<sup>-1</sup>. O três imunossensores propostos foram empregados com sucesso na determinação dos biomarcadores cardíacos em amostras de soro simulado e de plasma sanguíneo.

**Palavras-chave:** Imunossensores. Cristal Líquido. Nanopartículas de ouro. Biomarcadores cardíacos.



## ABSTRACT

This work reports the development of three new label-free electrochemical immunosensors constructed using liquid crystal (LC) molecules and gold nanoparticles (AuNP), for detection of myoglobin (Mb), troponin T (cTnT) and troponin I (cTnI), which are important biomarkers for the diagnosis of cardiac diseases, such as acute myocardial infarction. The first presented immunosensor was constructed from the combination of ionic LC, (*E*)-1-decyl-4-[(4-decyloxyphenyl)diazenyl]pyridinium bromide (Br-Py) as a voltammetric probe and AuNP stabilized in polyethyleneimine. This platform was used to covalent immobilization of anti-Mb antibodies. To our knowledge this was one of the first published works employing LC molecules for the development of an electrochemical immunosensor. This immunosensor was optimized for determination of Mb by inhibition of the signal of the Br-Py probe obtained by square wave voltammetry. The concentration working range was obtained from 10 to 72.8 ng mL<sup>-1</sup> with limit of detection (LOD) of 6.3 ng mL<sup>-1</sup>. The second immunosensor was constructed employing the same redox probe Br-Py which was combined with AuNP stabilized in silsesquioxane, this matrix was employed to immobilization of anti-cTnT antibodies via electrostatic interaction. After optimization of the parameters of construction and operation a cTnT calibration curve was obtained. The concentration working range obtained was 0.1 to 0.9 ng mL<sup>-1</sup> with a LOD of 0.08 ng mL<sup>-1</sup>. The third immunosensor was constructed with a columnar LC molecule, derivative from 1,3,4-oxadiazole, and AuNP stabilized in polyallylamine hydrochloride, this matrix was employed for covalent immobilization of anti-cTnI antibodies. The formation of the immunocomplex studies were performed, employed as a redox probe the couple Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, using the inhibition of the linear voltammetric signal, or R<sub>ct</sub> from electrochemical spectroscopy impedance. After optimization of the parameters of construction and operation, the calibration curve for cTnI was obtained with a working concentration range from 0.01 to 0.3 ng mL<sup>-1</sup> with a LOD of 0.005 ng mL<sup>-1</sup>. The three proposed immunosensors were successfully employed in the determination of cardiac biomarkers in samples of simulated serum and blood plasma.

**Keywords:** Immunosensors. Liquid crystal. Gold nanoparticle. Cardiac biomarkers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Método ELISA do tipo direto. Representação das etapas de imunodeteccção.....	21
<b>Figura 2.</b> Método ELISA do tipo indireto (tipo <i>sanduíche</i> ). Representação das etapas de imunodeteccção. ....	22
<b>Figura 3.</b> Método ELISA do tipo competitivo. Representação das etapas de imunodeteccção.....	22
<b>Figura 4.</b> Princípio de funcionamento de um imunossensor eletroquímico: (A) com marcação e (B) sem marcação (inibição da resposta). ....	24
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular do anticorpo (IgG): (A) Visão geral das cadeias leves e pesadas; (B) Destaque para região dos sítios de ligação com o antígeno (Adaptada de BENJAMINI <i>et al.</i> , 2000). ....	26
<b>Figura 6.</b> (A) Modificação da superfície com criação de grupos funcionais; (B) Modificação da superfície com espaçadores para orientação das biomoléculas na imobilização. ....	28
<b>Figura 7.</b> Estrutura do (A) glutaraldeído e (B) glioxal. (C) Esquema reacional do suporte aminado com uma proteína usando glioxal como reagente de ligação cruzada.....	29
<b>Figura 8.</b> (A) Estrutura do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). (B) Estrutura da N-hidroxissuccinimida (NHS). (C) Esquema reacional do EDC com NHS entre o suporte e a biomolécula (HAYWORTH, 2014).....	30
<b>Figura 9.</b> Possível arranjo estrutural de compostos anfifílicos: (a) moléculas anfifílicas formadoras de mesofase liotrópica, (b) arranjo lamelar, (c) secção de micela normal, (d) secção de micela reversa, (e) fase hexagonal (reproduzido de WESTPHAL, 2009). ....	32
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática de moléculas de CL em forma de (A) bastonetes e (B) de discos (adaptada de CARDOSO, 2007 e WESTPHAL, 2009). ....	33
<b>Figura 11.</b> Formação de uma banda de condução devido ao empacotamento colunar (Adaptada de LASCHAT <i>et al.</i> , 2007).....	33
<b>Figura 12.</b> Estabilização de nanopartículas por (A) método estérico e (B) eletrostático.....	35
<b>Figura 13.</b> Nanoestruturas frequentemente empregadas no desenvolvimento de biossensores: (A) nanopartículas, (B) nanotubos e (C) nanofios.....	36
<b>Figura 14.</b> Concentração dos biomarcadores cardíacos, em função dos níveis de referência para um indivíduo relativa saudável, em função do tempo após o infarto (Adaptada de MCCORD, 2011). ....	40

<b>Figura 15.</b> Imagens de TEM para AuNP estabilizada em PEI. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula do com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de BRONDANI <i>et al.</i> , 2013).....	45
<b>Figura 16.</b> Imagens de TEM para AuNP estabilizadas em Sil. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de SILVA <i>et al.</i> , 2014A). .....	46
<b>Figura 17.</b> Imagens de TEM para AuNP estabilizadas em PAH. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula do com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de SILVA <i>et al.</i> , 2014B). .....	46
<b>Figura 18.</b> Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de Br-Py sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-PEI. 3. Ativação dos grupos amino do polímero com glioxal e imobilização covalente das moléculas de ab-Mb. 4. Bloqueio da superfície com glicina.....	48
Figura 19. Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de Br-Py sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-Sil. 3. Imobilização das moléculas de ab-cTnT por adsorção. 4. Bloqueio da superfície com glicina. ....	49
<b>Figura 20.</b> Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de CL <sub>col</sub> sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-PAH. 3. Imobilização covalente das moléculas de ab-cTnI usando EDC/NHS. 4. Bloqueio da superfície com glicina. ....	50
<b>Figura 21.</b> (A) Representação esquemática da superfície do imunossensor à base de Br-Py. (B) Resposta voltamétrica em solução de PBS (pico base) e resposta após incubação em 44,2 ng mL <sup>-1</sup> de Mb. ...	52
<b>Figura 22.</b> Proposta de reação de redução/oxidação para a molécula de Br-Py. ....	53
<b>Figura 23.</b> (A) Voltamogramas cíclicos para o efeito da variação do pH (6–8) em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> ) sobre a resposta do eletrodo modificado com Br-Py a 100 mV s <sup>-1</sup> . (B) Variação dos potenciais de pico com o pH. ....	54
<b>Figura 24.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> para: (a) GCE, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> ; pH 7,5).....	55
<b>Figura 25.</b> Diagramas de Nyquist para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE em solução de KCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ) contendo Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> (5 mmol L <sup>-1</sup> ), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência	

de 0,1–100.000 Hz. Inserido: (a) GCE não modificado (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE. ....	57
<b>Figura 26.</b> Imagens de FEG-SEM para: (A) GCE não modificado, (B) Br-Py/GCE, (C) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (D) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE, observadas a 10 kV. ....	58
<b>Figura 27.</b> Microscopia óptica polarizada (200 X) de uma solução concentrada de Br-Py em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> à temperatura ambiente. ....	59
<b>Figura 28.</b> Otimização da quantidade de (A) Br-Py (Faixa estudada: 0,5 a 3 µL) e (B) AuNP-PEI (Faixa estudada: 1 a 4 µL) usando SWV em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5.....	60
<b>Figura 29.</b> Efeito da variação do pH (6–8) da solução de PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> ) sobre a resposta do imunossensor empregando a SWV. ....	61
<b>Figura 30.</b> Efeito dos parâmetros de SWV na resposta analítica do eletrodo modificado: (A) frequência (faixa de estudo: 10 –100 Hz) com incremento de 5 mV e amplitude de 50 mV; (B) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 50 Hz e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 60 Hz e incremento de 4 mV. ....	62
<b>Figura 31.</b> Efeito do tempo de incubação (1 a 60 min) para imunossensor empregando 10 ng mL <sup>-1</sup> de Mb em 0,01 mol L <sup>-1</sup> PBS (pH 7,5). ....	63
<b>Figura 32.</b> Estudo de compostos potencialmente interferentes em relação à resposta do imunossensor, compostos testados: glicose (200 mg L <sup>-1</sup> ), creatinina (10 mg L <sup>-1</sup> ), ácido ascórbico (10 mg L <sup>-1</sup> ), ácido úrico (10 mg L <sup>-1</sup> ) e dopamina (10 mg L <sup>-1</sup> ). ....	65
<b>Figura 33.</b> (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento 4 mV para: (a) pico base (PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5), (b) controle (incubação em PBS), (c) 10 ng mL <sup>-1</sup> , (d) 19,8 ng mL <sup>-1</sup> , (e) 29,6 ng mL <sup>-1</sup> , (f) 42,2 ng mL <sup>-1</sup> , (g) 58,6 ng mL <sup>-1</sup> e (h) 72,8 ng mL <sup>-1</sup> de Mb. (B) curva de calibração para mioglobina.....	66
<b>Figura 34.</b> Representação esquemática da superfície do imunossensor. (B) Voltamogramas de onda quadrada na ausência ( - ) e na presença de cTnT ( - ). ....	70
<b>Figura 35.</b> Comportamento eletroquímico: (A) Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-Sil/Br-Py/GCE, (d) ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE e (e) gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE. (B) Diagrama de Nyquist obtidos em KCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ) contendo Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> (5 mmol L <sup>-1</sup> ) em modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	

contendo para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-Sil/Br-Py/GCE, (d) ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE e (e) gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE.....	72
<b>Figura 36.</b> Imagens de FEG-SEM de: (A) GCE não modificado, (B) Br-Py/GCE, (C) ab-cTnT/AuNP/Br-Py/GCE, e (D) gly/ab-cTnT/AuNP-Si4Pic <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> /Br-Py/GCE, obtidas utilizando 10 kV.....	73
<b>Figura 37.</b> Proposta de para reação de imobilização usando AuNP-Sil (A) como suporte para imobilização do anticorpo ab-cTnT (B) por interação eletrostática (C).....	74
<b>Figura 38.</b> Otimização da quantidade de (A) Br-Py (Faixa estudada: $0,1 \times 10^{-3}$ a $1,5 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> ) e (B) AuNP-Sil (Faixa estudada: 1 a 4 $\mu$ L) usando SWV em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5.....	75
<b>Figura 39.</b> Efeito dos parâmetros de SWV na resposta analítica do eletrodo modificado: (A) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 50 Hz e amplitude de 50 mV; (B) frequência (faixa de estudo: 10 –100 Hz) com incremento de 10 mV e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 100 Hz e incremento de 10 mV. ....	76
<b>Figura 40.</b> Influência do pH de 3,0 a 9,0 na imobilização de ab-cTnT sobre o filme de AuNP-Sil medida por EIS obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz.....	77
<b>Figura 41.</b> (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com frequência de 100 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 4 mV usando o imunossensor proposto para: (a) pico base (PBS 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5), (b) 0,1 ng mL <sup>-1</sup> , (c) 0,3 ng mL <sup>-1</sup> , (d) 0,5 ng mL <sup>-1</sup> , (e) 0,7 ng mL <sup>-1</sup> e (f) 0,9 ng mL <sup>-1</sup> de cTnT. (B) Curva de calibração para cTnT. ....	79
<b>Figura 42.</b> (A) Representação esquemática da superfície do imunossensor. (B) Picos voltamétricos na ausência e presença de cTnI; (C) Estrutura química do cristal líquido colunar. ....	85
<b>Figura 43.</b> Imagens de POM de: (A) CL <sub>col</sub> /GCE sem aquecimento e (B) CL <sub>col</sub> /GCE após aquecimento a 40°C.....	86
<b>Figura 44.</b> Imagens de POM para: (A) GCE, (B) CL <sub>col</sub> /GCE após aquecimento a 40°C, (C) AuNP/CL <sub>col</sub> /GCE e (D) ab-cTnI/AuNP/CL <sub>col</sub> /GCE.....	87
<b>Figura 45.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> para o filme de CL <sub>col</sub> /GCE em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5).....	88
<b>Figura 46.</b> (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> para: (a) GCE não modificado, (b) CLcol/GCE	

sem aquecimento e (c) CLcol/GCE com aquecimento em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 89

**Figura 47.** Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: (a) GCE não modificado, (b) CLcol/GCE sem aquecimento e (c) CLcol/GCE com aquecimento em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 89

**Figura 48.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> para: (a) AuNP-PAH/CLcol/GCE, (b) ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE, (c) gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE e (d) 0,3 ng mL<sup>-1</sup> cTnI: gli/ab-TnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 92

**Figura 49.** Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: (a) AuNP-PAH/CLcol/GCE, (b) ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE, (c) gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE e (d) 0,3 ng mL<sup>-1</sup> cTnI: gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 93

**Figura 50.** (A) Voltamogramas cíclicos para gly/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, com velocidade de varredura de 25 a 1000 mV s<sup>-1</sup>. 94

**Figura 51.** Gráfico da corrente de pico anódico (i<sub>pa</sub>) e catódico (i<sub>pc</sub>) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura (v) em (A) 25 a 1000 mV s<sup>-1</sup> e em (B) 25 a 400 mV s<sup>-1</sup> para uma solução de PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 95

**Figura 52.** Gráfico de E<sub>pa</sub> and E<sub>pc</sub> vs. logaritmo da velocidade de varredura (v) para os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 50. .... 95

**Figura 53.** Voltamogramas lineares para três medidas consecutivas obtidas usando o imunossensor com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> na ausência de cTnI. Inserido: variação da resposta..... 97

**Figura 54.** Diagramas de Nyquist para três medidas consecutivas obtidas com o imunossensor em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> na ausência de cTnI. Inserido: variação da resposta..... 97

**Figura 55.** Voltamogramas de onda quadrada para três medidas consecutivas obtidas com o imunossensor em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> na ausência de cTnI, com

frequência de 50 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 5 mV. Inserido: Variação da resposta. ....	98
<b>Figura 56.</b> Efeito da concentração de $CL_{col}$ (0,1 a 10 mg mL <sup>-1</sup> ) sobre a resposta do sensor imerso em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> , com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> . ....	99
<b>Figura 57.</b> Efeito da quantidade de AuNP-PAH em diferentes proporções (0 a 10x) na resposta da sonda redox obtidos por voltametria linear com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> . ....	100
<b>Figura 58.</b> (A) Diagrama de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE para incubação com 0,3 ng mL <sup>-1</sup> cTnI em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> , para avaliar o efeito do tempo de incubação (2 a 60 min). (B) Porcentagem de inibição em função do tempo. ....	101
<b>Figura 59.</b> Efeito da concentração de cTnI obtido na faixa de 4,18x10 <sup>-12</sup> a 1,26x10 <sup>-11</sup> mol L <sup>-1</sup> com tempo de incubação de 10 min em função da variação da resistência a transferência de carga obtidas por EIS em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz em PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> . ....	102
<b>Figura 60.</b> (A) Voltamogramas lineares obtidos com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> em: (a) PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> e imunossensor incubado com: (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 0,2, e (f) 0,3 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI. (B) Curva de calibração para cTnI. ....	103
<b>Figura 61.</b> (A) Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz com o imunossensor para cTnI em (a) PBS (0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,5) contendo 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> e após incubação com: (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 0,2, e (f) 0,3 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI. (B) Curva de calibração para cTnI. ....	104
<b>Figura 62.</b> Estudo de compostos potencialmente interferentes presentes em uma amostra de soro e detecção de 0,1 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI: creatinina (4,2 mg L <sup>-1</sup> ), creatina (10,7 mg L <sup>-1</sup> ), glicose (200 mg L <sup>-1</sup> ), ácido úrico (10 mg L <sup>-1</sup> ), ácido ascórbico (10 mg L <sup>-1</sup> ), BSA (40 mg L <sup>-1</sup> ), Mb (10 ng mL <sup>-1</sup> ). ....	105
<b>Figura 63.</b> (A) Imunossensor construído sobre um eletrodo impresso de carbono. (B) Detecção voltamétrica de 0,3 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI em plasma sanguíneo. ....	107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Alguns exemplos de analitos detectados com imunossensores .....	37
<b>Tabela 2.</b> Resumo dos parâmetros de otimização avaliados e as melhores respostas obtidas .....	64
<b>Tabela 3.</b> Determinação de Mb em amostras simuladas.....	66
<b>Tabela 4.</b> Comparação de diferentes imunossensores aplicados na determinação de Mb .....	67
<b>Tabela 5.</b> Resumo dos parâmetros de otimização avaliados e as melhores respostas obtidas .....	78
<b>Tabela 6.</b> Estudo de compostos potencialmente interferentes .....	80
<b>Tabela 7.</b> Determinação de cTnT em soro sintético e plasma sanguíneo (contendo $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de cTnT) .....	80
<b>Tabela 8.</b> Comparação de diferentes imunossensores para troponina baseado em vários métodos e materiais .....	81
<b>Tabela 9.</b> Determinação de cTnI em plasma sanguíneo, dados obtidos a partir do método voltamétrico .....	106
<b>Tabela 10.</b> Comparação de diferentes imunossensores para cTnI baseado em vários métodos e materiais .....	106



## LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

- ab-Mb** – Anticorpo anti-mioglobina  
**ab-cTnT** – Anticorpo anti-troponina T cardíaca  
**ab-cTnI** – Anticorpo anti-troponina I cardíaca  
**AuNP-PEI** – Nanopartículas de ouro estabilizadas em polietilenoimina  
**AuNP-PAH** – Nanopartículas de ouro estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina  
**AuNP-Sil** – Nanopartículas de ouro estabilizadas em silsesquioxano  
**Br-Py** – Brometo de (*E*)-1-[4-deciloifenil]-2-(4-(1-decilpiridínio) diazeno)  
**C<sub>d</sub>** – Capacitância da dupla camada elétrica  
**CE** – Contra-eletrodo (*Counter electrode*)  
**CL** – Cristal líquido  
**CK-MB** – Creatina fosfoquinase  
**cTnI** – Troponina I cardíaca  
**cTnT** – Troponina T cardíaca  
**CV** – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)  
**EDC** – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida  
**EIS** – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical impedance spectroscopy*)  
**ELISA** – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immuno sorbent assay*)  
**GCE** – Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)  
**HRP** – Peroxidase de raiz forte (*Horseradish peroxidase*)  
**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure Applied Chemistry*)  
**IAM** – Infarto agudo do miocárdio  
**LSV** – Voltametria linear (*Linear sweep voltammetry*)  
**Mb** – Mioglobina  
**NP** – Nanopartículas  
**NHS** – N-hidroxisuccinimida  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**PBS** – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)  
**PAH** – Hidrocloreto de polialilamina (*Poly(allylamine) hydrochloride*)  
**PEI** – Polietilenoimina  
**POCT** – Testes à beira do leito (*Point-of-care testing*)  
**R<sub>ct</sub>** – Resistência à transferência de carga (*Charge-transfer resistance*)  
**RE** – Eletrodo de referência (*Reference electrode*)  
**R<sub>s</sub>** – Resistência da solução eletrolítica

**SEM** – Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning electron microscopy*)

**FEG** – Canhão de emissão de campo (*Field emission gun*)

**SWV** – Voltametria de onda quadrada (*Square-wave voltammetry*)

**TEM** – Microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission electron microscopy*)

**WE** – Eletrodo de trabalho (*Working electrode*)

**$Z_w$**  – Impedância de Warburg

**$Z'$**  – Componente real da impedância

**$Z''$**  – Componente imaginária da impedância

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
<b>1.1. BIOSSENSORES</b> .....	19
<b>1.1.1. Imunossensores</b> .....	20
<b>1.1.2. Funcionamento dos imunossensores eletroquímicos</b> .....	23
1.1.2.1. Imunossensores eletroquímicos com marcação e sem marcação .....	23
<b>1.1.3. Anticorpos</b> .....	25
<b>1.3. IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE O   ELETRODO</b> .....	26
<b>1.3.1. Materiais e reações covalentes de imobilização</b> .....	27
1.3.1.1. Principais reações e reagentes de ligação empregados para imobilização .....	28
<b>1.4. CRISTAIS LÍQUIDOS</b> .....	30
<b>1.4.1. Classes de cristais líquidos</b> .....	31
<b>1.4.2. Aplicações de cristais líquidos</b> .....	34
<b>1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS</b> .....	34
<b>1.6. APLICAÇÃO DE IMUNOSSENSORES</b> .....	36
<b>1.7. DOENÇAS CARDÍACAS</b> .....	37
<b>1.7.1. Biomarcadores cardíacos</b> .....	38
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	41
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	41
<b>2.2.1. Imunossensor <i>label-free</i> à base de AuNP estabilizadas em     polietilenoimina (PEI) e CL como sonda redox para detecção     de Mb</b> .....	41
<b>2.2.2. Imunossensor <i>label-free</i> à base de AuNP estabilizadas em     silsesquioxano (Sil) e CL como sonda redox para detecção de     cTnT</b> .....	41
<b>2.2.3. Imunossensor <i>label-free</i> à base de CL colunar e AuNP     estabilizadas em hidrócloro de polialilamina (PAH) para     detecção de cTnI</b> .....	42
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGIA</b> .....	43
<b>3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES</b> .....	43
<b>3.1.1. Amostras</b> .....	43
<b>3.1.2. Moléculas de CL e sondas eletroquímicas</b> .....	44
<b>3.1.3. Síntese e caracterização das AuNP</b> .....	44
<b>3.2. INSTRUMENTAÇÃO</b> .....	47
<b>3.3. PREPARAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES</b> .....	47
<b>3.3.1. Montagem do imunossensor para Mb</b> .....	47

3.3.2. Montagem do imunossensor para cTnT .....	48
3.3.3. Montagem do imunossensor para cTnI .....	49
<b>CAPÍTULO 4. IMUNOSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLIETILENOIMINA PARA DETECÇÃO DE MIOGLOBINA .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
4.1.1. Princípio de funcionamento do imunossensor .....	52
4.1.2. Comportamento eletroquímico do sensor Br-Py .....	53
4.1.3. Imagens da superfície dos sensores .....	57
4.1.4. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor .....	59
4.1.5. Estudo de interferentes e reprodutibilidade .....	64
4.1.6. Curva de calibração para Mb .....	65
4.1.7. Determinação de Mb .....	66
<b>CAPÍTULO 5. IMUNOSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE TROPONINA T .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
5.1.1. Princípio de funcionamento .....	70
5.1.2. Comportamento eletroquímico .....	71
5.1.3. Caracterização morfológica da superfície do imunossensor .....	72
5.1.5. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor .....	74
5.1.7. Reprodutibilidade e estabilidade .....	79
5.1.8. Estudo de possíveis composto interferentes .....	79
5.1.9. Aplicação do imunossensor na determinação de cTnT ..	80
<b>CAPÍTULO 6. IMUNOSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO COLUNAR E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE TROPONINA I EM PLASMA .....</b>	<b>83</b>
<b>6.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
6.1.1. Princípio de funcionamento .....	84
6.1.2. Caracterização morfológica da superfície do imunossensor .....	85
6.1.3. Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados .....	87
6.1.3.1. Avaliação do filme de CL <sub>col</sub> por CV .....	87
6.1.4. Efeito da velocidade de varredura .....	93
6.1.5. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor .....	95

6.1.5.1. Seleção de técnica eletroquímica.....	96
6.1.5.2. Quantidade de $CL_{col}$ e AuNP-PAH .....	98
6.1.5.3. Tempo de incubação e constante de associação .....	100
<b>6.1.6. Curva de calibração para cTnI .....</b>	<b>102</b>
<b>6.1.7. Estudo de possíveis composto interferentes e reprodutibilidade.....</b>	<b>104</b>
<b>6.1.8. Aplicação do imunossensor na determinação de cTnI .</b>	<b>105</b>
<b>6.1.9. Teste preliminar para miniaturização do sistema .....</b>	<b>107</b>
<b><i>CAPITULO 7. CONCLUSÕES</i> .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>



## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1. BIOSSENSORES

Sensor químico é um dispositivo que detecta informações químicas provenientes de uma reação química do analito e transforma em um sinal mensurável. Todos os sensores químicos contêm dois componentes funcionais básicos: um sistema de reconhecimento (receptor) e um transdutor (HULANICKI *et al.*, 1991).

Biossensores constituem uma classe de sensores químicos em que o sistema usa um mecanismo de reconhecimento biológico em vez de um processo apenas químico. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure Applied Chemistry* – IUPAC), biossensor é um dispositivo integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor), o qual é mantido em contato direto com um elemento de transdução (THÉVENOT *et al.*, 2001).

A finalidade principal do biorreceptor é fornecer ao sensor um alto grau de seletividade e/ou especificidade para a molécula de interesse (THÉVENOT *et al.*, 2001). Exemplos de biorreceptores podem ser moléculas ou tecido biológicos, incluindo enzimas, oligonucleotídeos, organelas, tecidos, células, microorganismos e anticorpos (MELLO e KUBOTA, 2002; D’ORAZIO, 2003; CÂMPAS *et al.*, 2008). A interação do elemento de reconhecimento com o “analito-alvo” resulta na variação de alguma propriedade físico-química do sistema, e pode ser medida por diferentes transdutores dependendo do tipo de propriedade físico-química detectada, os quais podem ser classificados em quatro classes: eletroquímicos (fluxo de elétrons em espécies eletroativas), ópticos (medida da luminescência ou fluorescência), piezoelétrico (alteração de massa) e térmicos (absorção ou emissão de radiação eletromagnética). A transdução eletroquímica devido à sua grande versatilidade pode ser usada com sucesso no processo de reconhecimento da biointeração do biorreceptor. O princípio básico destes tipos de biossensores é a medida de propriedades elétricas tais como, corrente, potencial e resistência. De acordo com a natureza da transdução, os dispositivos eletroquímicos utilizados podem ser potenciométricos, amperométricos, voltamétricos ou impedimétricos. Nesse trabalho, daremos ênfase aos biossensores voltamétricos e impedimétricos. Os biossensores voltamétricos são baseados em medidas do fluxo de elétrons entre uma espécie eletroativa e a superfície

de um eletrodo, quando o mesmo é submetido a um programa de potencial. A corrente resultante pode ser medida através de diferentes técnicas voltamétricas, tais como a voltametria cíclica (*cyclic voltammetry* – CV), linear (*linear sweep voltammetry* – LSV), e de onda quadrada (*square-wave voltammetry* – SWV). Os biossensores impedimétricos são baseados em medidas de impedância (resistência) do sistema após a superfície do sensor interagir com uma molécula alvo, quando o mesmo é submetido à aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente alternada (sinal senoidal).

O processo de bioreconhecimento pode acontecer de duas principais formas, de acordo com o elemento biológico empregado, sendo elas: reação biocatalítica (ex.: enzimas – reconhecimento de substrato específico), e interação por afinidade (ex.: complexo antígeno-anticorpo – reconhecimento das sequências de aminoácidos específicos) (MONOŠÍK *et al.*, 2012).

### 1.1.1. Imunossensores

Os imunossensores são biossensores altamente sensíveis e seletivos, onde a material biológico é composto por anticorpos que são capazes de reconhecer especificamente um determinado antígeno. O princípio da imunodeteção baseia-se em mensurar a intensidade de formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo, podendo ser realizado pelo emprego de diferentes metodologias.

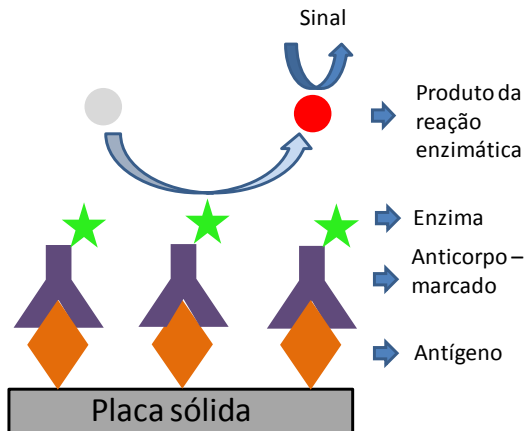
O ensaio do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA) é um ensaio bioquímico que utiliza uma fase sólida para a detecção da presença de uma substância, normalmente um antígeno em uma amostra líquida, sendo um dos testes comerciais mais empregados para o diagnóstico de doenças (LEQUIN, 2005). A detecção da formação do imunocomplexo é obtida a partir de moléculas de anticorpo quimicamente marcadas, que geram sinais mensuráveis em técnicas como: colorimetria (LEI *et al.*, 2010), fluorescência (BOUÇAS *et al.*, 2008), quimiluminescência (ZHAO *et al.*, 2009) e eletroquímica (CAVALCANTI *et al.*, 2012). O ensaio ELISA para detecção de um dado antígeno pode ser usado com diferentes configurações, incluindo método direto, indireto e competitivo.

No método direto (Figura 1), as etapas de imunodeteção consistem em: 1. A superfície da placa é preparada com uma quantidade conhecida de um antígeno conhecido. 2. Os demais sítios para possíveis ligações são então bloqueados (comumente com moléculas de albumina). 3. Sobre a placa são então adicionados anticorpos marcados



com uma enzima (Ex.: peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase* – HRP)). 5. A enzima quando em contato com o seu substrato gera um produto cromogênico ou fluorescente.

**Figura 1.** Método ELISA do tipo direto. Representação das etapas de imunodeteção.

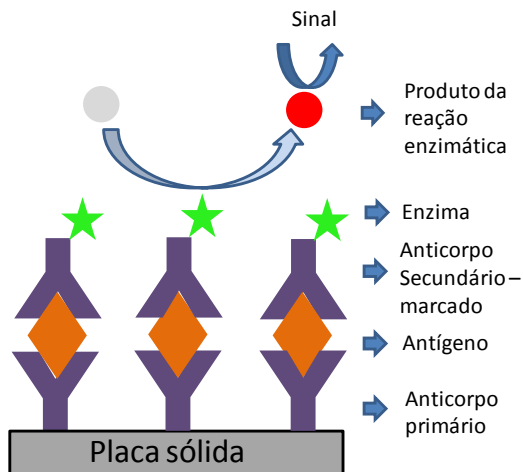


As etapas de imunodeteção envolvidas no teste ELISA indireto ou tipo sanduíche (Figura 2) consistem em: 1. Uma superfície é preparada com uma quantidade conhecida de anticorpos primários. 2. Os demais sítios para possíveis ligações são então bloqueados. 3. Uma amostra contendo o antígeno é aplicada sobre a placa, a placa é então lavada para remoção de moléculas que não se ligaram aos anticorpos primários. 4. Um segundo anticorpo marcado com uma enzima é adicionado, e liga-se ao antígeno (formando um "sanduíche", ou seja, um antígeno entre duas moléculas de anticorpos). 5. A enzima quando em contato com o seu substrato gera um produto cromogênico ou fluorescente.

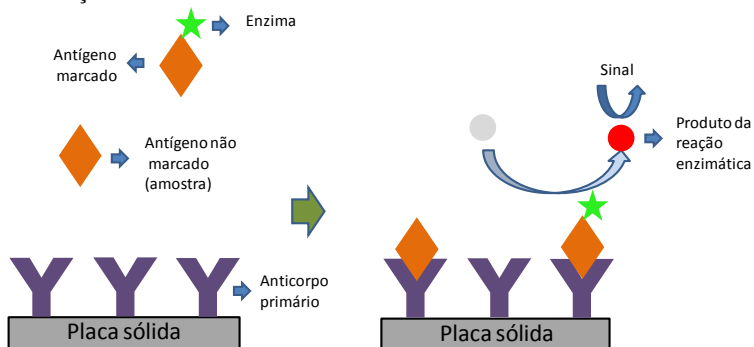
Uma terceira maneira de se trabalhar com imunodeteção usando o teste ELISA é através de um ensaio competitivo (Figura 3). As etapas para este ensaio consistem em: 1. Uma superfície é preparada com uma quantidade conhecida de anticorpos primários. 2. Os demais sítios para possíveis ligações são então bloqueados. 3. Uma amostra contendo o antígeno não marcados (amostra) e antígenos marcados competem pelo sítio de ligação do anticorpo imobilizado na placa, a placa é então lavada para remoção de moléculas que não se ligaram aos

anticorpos primários. 5. A enzima quando em contato com o seu substrato gera um produto cromogênico ou fluorescente.

**Figura 2.** Método ELISA do tipo indireto (tipo *sanduíche*). Representação das etapas de imunodeteção.



**Figura 3.** Método ELISA do tipo competitivo. Representação das etapas de imunodeteção.



## 1.1.2. Funcionamento dos imunossensores eletroquímicos

À medida que a superfície do imunossensor contendo os anticorpos específicos é exposta a uma amostra contendo o antígeno alvo, ocorre à ligação específica e formação do complexo anticorpo-antígeno. Assim, diferentes estratégias podem ser empregadas para a detecção do imunocomplexo formado, como por exemplo: ensaios competitivos com anticorpos marcados com enzimas, supressão de respostas de mediadores eletroquímicos e mudanças na condutividade da superfície do eletrodo. Um exemplo da aplicação desta metodologia de análise imunológica é o diagnóstico de doenças como o infarto agudo do miocárdio (IAM), através da detecção de biomarcadores cardíacos (RICCARDI *et al.*, 2002).

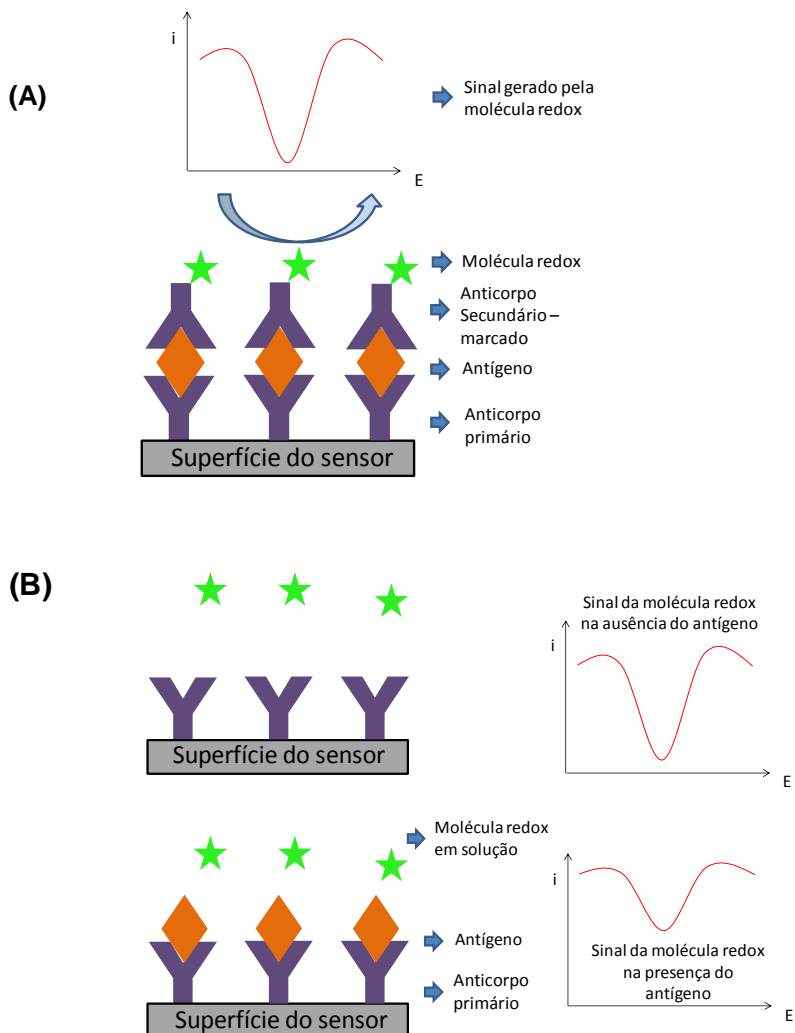
### 1.1.2.1. Imunossensores eletroquímicos com marcação e sem marcação

Diferentemente do imunoenensaio empregado no método ELISA clássico, o uso de imunossensores eletroquímicos nem sempre necessita da marcação do anticorpo para o seu funcionamento. Esses biossensores baseiam-se na formação de imunocomplexos, que são acompanhados por alterações em uma sonda redox (RICCARDI *et al.*, 2002; RICCI *et al.*, 2007). A necessidade do uso de uma sonda redox se dá pelo fato de que tanto o antígeno quanto o anticorpo, são compostos eletroquimicamente inertes. Essas sondas são constituídas de espécies eletroquimicamente ativas e possuem a capacidade de sofrer reações de oxidação/redução em sua grande maioria de forma reversível. Os imunossensores eletroquímicos podem ser construídos segundo duas abordagens: sistemas com marcação do anticorpo e os sistemas não marcados (*label-free*), como mostrado na Figura 4 (RICCARDI *et al.*, 2002; RICCI *et al.*, 2012).

Nos sistemas não marcados, a resposta analítica é proveniente de uma sonda redox imobilizada no eletrodo de trabalho ou então dissolvida em solução, nestes sistemas é acompanhada uma supressão do sinal, conforme um único evento de imunorreconhecimento se processa na superfície do eletrodo (LIANG *et al.*, 2011).

Nos sistemas marcados, dois eventos de imunorreconhecimento são requeridos, sendo a resposta analítica proveniente do segundo evento, onde ocorre à formação de um imunocomplexo, entre o antígeno e uma segunda molécula de anticorpo marcada com uma sonda redox; esse método é semelhante ao ELISA (LIANG *et al.*, 2011).

**Figura 4.** Princípio de funcionamento de um imunossensor eletroquímico: (A) com marcação e (B) sem marcação (inibição da resposta).



As sondas redox comumente utilizadas constituem-se de moléculas com atividade redox bem estabelecida, como por exemplo, mediadores eletroquímicos como o ferroceno, complexos metálicos de cobalto, rutênio, ferro, corantes principalmente contendo grupo azo e

enzimas oxidoredutases (RICCARDI *et al.*, 2002; RAMÍREZ *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2011). Os marcadores enzimáticos mais usados são a HRP e a fosfatase alcalina por apresentarem alguns requisitos indispensáveis, como alta pureza, alta atividade específica, possuírem um substrato estável e serem facilmente conjugáveis ao sistema eletroquímico. Outras características principais que um bom mediador deve apresentar são: não reagir com o oxigênio, ser estável em ambas as formas (oxidada e reduzida), mostrar cinética de transferência de elétrons reversível, além de possuir baixo potencial redox (MEHRVAR e ABDI, 2004; CHAUBEY e MALHOTRA, 2002; YOO e LEE, 2010).

### 1.1.3. Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas, também chamadas de imunoglobulinas (Ig), altamente específicas sintetizadas em resposta a um antígeno, podendo reconhecer, se ligar, neutralizar, ou destruir esse antígeno. Existem cinco classes de imunoglobulinas, sendo elas: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgY com diferentes propriedades biológicas e localizações funcionais (MARTIN, 1969).

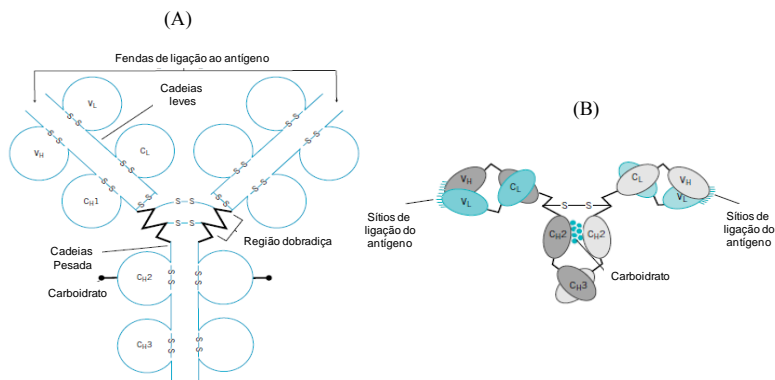
As principais características morfológicas dos anticorpos são: suas cadeias pesadas (*heavy chains* – C<sub>H</sub>) e suas cadeias leves (*light chains* – C<sub>L</sub>) (Figura 5). Essas cadeias podem ser divididas em duas classes: constantes e hipervariáveis. As regiões constantes, também denominadas de C-terminal, tem a função de ancorar o anticorpo. Já as regiões hipervariáveis (ou regiões determinantes de complementaridade), também denominadas de N-terminal ou de ligação, estão localizadas nos domínios V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> – variáveis, que é a superfície responsável pela ligação com o antígeno, e, portanto, determina a especificidade do anticorpo (BENJAMINI *et al.*, 2000).

A característica básica da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas. Esta complementaridade permite a aproximação máxima do antígeno aos sítios de ligação das moléculas de anticorpo.

As ligações envolvidas na formação do imunocomplexo são de natureza não covalente, e, portanto, consideradas reversíveis. A interação antígeno-anticorpo é o resultado da somatória de forças intermoleculares, incluindo hidrofóbicas, eletrostáticas, forças de hidrogênio e forças de van der Waals. Embora as interações sejam individualmente fracas, a multiplicidade das uniões leva a uma

considerável energia de coesão entre o antígeno e o anticorpo (SOUZA *et al.*, 1999; RICCARDI *et al.*, 2002).

**Figura 5.** Estrutura molecular do anticorpo (IgG): (A) Visão geral das cadeias leves e pesadas; (B) Destaque para região dos sítios de ligação com o antígeno (Adaptada de BENJAMINI *et al.*, 2000).



### 1.3. IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE O ELETRODO

Tendo em vista que a tecnologia imunológica baseia-se na formação de complexos com alta especificidade entre um anticorpo e um dado antígeno, portanto, para que isso ocorra de forma adequada, algumas condições precisam ser estabelecidas na superfície de reconhecimento. Essas condições que favorecem o reconhecimento eficaz e seletivo dos antígenos sobre o eletrodo dependem da organização na superfície do sensor e são alcançadas com a correta imobilização das moléculas, com o uso de plataformas robustas e que permitam uma rápida medida da propriedade elétrica desenvolvida durante a etapa de imunorreconhecimento (RICCARDI *et al.*, 2002).

Desta forma, os principais métodos de imobilização dos anticorpos (ou antígenos) devem ser conhecidos, a fim de se fazer a escolha do método mais adequado para a aplicação desejada.

A imobilização por adsorção é um método amplamente empregado, especialmente por ser simples, rápido e de baixo custo. Este procedimento consiste na união entre a biomolécula e um suporte insolúvel através de interações fracas (interações de van der Waals,

ligações de hidrogênio e interações iônicas). Vários materiais podem ser utilizados para esse tipo de imobilização, tais como celulose, alumina, grafite, nanotubos de carbono, resinas de troca iônica, argilominerais, entre outros. Contudo, uma das principais desvantagens desse método é a possibilidade de desorção da biomolécula do suporte, devido às fracas interações envolvidas nesse tipo de imobilização, bem como a adsorção pode ocorrer com orientação desfavorável na superfície do suporte/eletrodo (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2011).

A imobilização por ligação covalente, a mais empregada na construção de imunossensores, ocorre entre os grupos funcionais não essenciais para a atuação da biomolécula (exemplos: amino, hidroxila, carboxila e tiol, em cadeias laterais) e os grupos reativos disponíveis na superfície do suporte (exemplos: amino, hidroxila e tiol). Em geral, este método envolve duas etapas: a ativação do suporte com um reagente específico (bi ou multifuncional), e a adição da biomolécula para formação da ligação entre as cadeias laterais da biomolécula e o suporte. Na imobilização por ligação covalente cruzada um reagente bi ou multifuncional (ex.: glioxal, glutaraldeído) é empregado, formando-se ligações de natureza covalente entre as cadeias do suporte e a biomolécula, porém mais de uma ligação é formada entre a biomolécula e o suporte, ou entre cadeias do suporte. Nas imobilizações por ligações covalentes, dificilmente a molécula irá desprender-se do suporte e a estabilidade diante de variações físico-químicas é aumentada (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2011).

A oclusão ou confinamento da biomolécula em matriz polimérica ocorre durante o processo de reticulação de um polímero insolúvel, sendo que a biomolécula fica presa nos espaços vazios formados na rede polimérica. Contudo, há possibilidade de inativação da reatividade da molécula, não estando a mesma mais disponível para interação com uma molécula alvo (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2011).

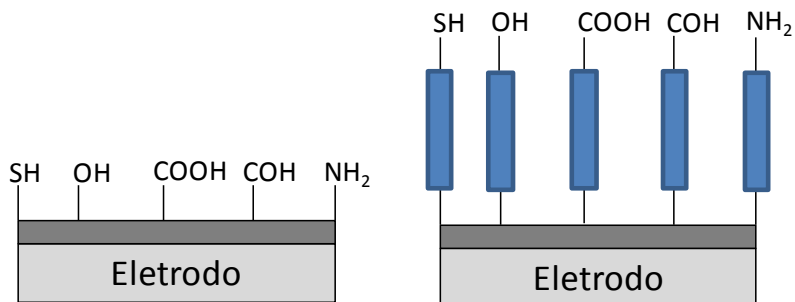
### **1.3.1. Materiais e reações covalentes de imobilização**

As reações de imobilização devem apresentar várias características importantes, tais como: a reação deve ocorrer rapidamente e permitir a utilização de baixas concentrações dos reagentes para a imobilização, os ligantes imobilizados devem ser orientados e com uma distribuição homogênea, e não devem ocorrer

reações com os sítios de ligação da biomolécula usados para reconhecimento (GÓRECKA e JASTRZEBSKA, 2011).

Para a imobilização de biomoléculas sobre eletrodos sólidos é necessária primeiramente a modificação da superfície do eletrodo, a fim de criar sobre essa superfície grupos funcionais reativos que são geralmente inexistentes no eletrodo não modificado/ativado (Figura 6-A) (Exemplos:  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-COH$ ,  $-SH$ ,  $-OH$ ) (GÓRECKA e JASTRZEBSKA, 2011; OLIVEIRA, 2011; RUSNINI *et al.*, 2007). Estes grupos funcionais do suporte reagem, então, com moléculas bifuncionais, por uma das extremidades, enquanto a outra extremidade deste reagente de imobilização forma uma ligação com um grupo reativo da biomolécula. No caso das biomoléculas, os grupos reativos frequentemente se resumem aos grupos N-terminal ( $-NH_2$ ) e C-terminal ( $-COOH$ ), em razão da sua natureza proteica (JACOB *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 1998; ESCOSURA-MUÑIZ *et al.*, 2010). Em alguns casos, a própria molécula bifuncional pode ser imobilizada na superfície do eletrodo, funcionando como um espaçador, auxiliando na orientação das biomoléculas na superfície do eletrodo (Figura 6-B), um exemplo dessa aplicação são as camadas auto-organizadas de alcanotióis sobre eletrodos de ouro (LIU *et al.*, 2013).

**Figura 6.** (A) Modificação da superfície com criação de grupos funcionais; (B) Modificação da superfície com espaçadores para orientação das biomoléculas na imobilização.



### 1.3.1.1. Principais reações e reagentes de ligação empregados para imobilização

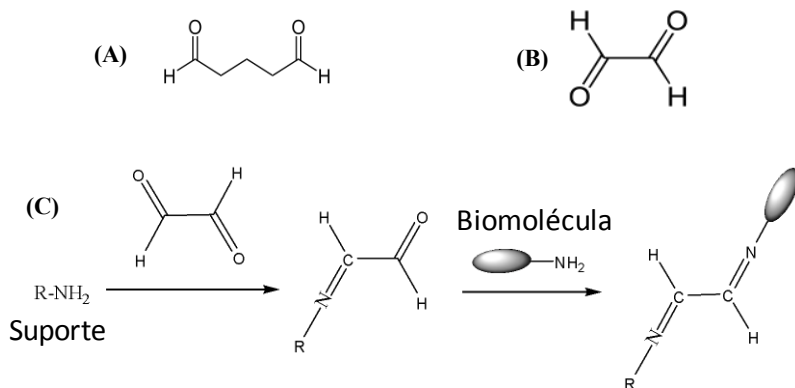
Os grupos funcionais encontrados nos suportes poliméricos podem ser empregados no processo de imobilização, sendo que os



grupos  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COH}$  e  $-\text{OH}$  são os mais utilizados, juntamente com reagentes ativadores para cada função química (RUSNINI *et al.*, 2007). A seguir são mostradas as principais reações empregadas na imobilização de biomoléculas assim como os reagentes mais comumente utilizados para a função de ativar o suporte e realizar uma ligação covalente cruzada com as biomoléculas.

O glutaraldeído (Figura 7-A) assim como o glioxal (Figura 7-B) são dialdeídos popularmente empregados para a ativação de suportes contendo grupos amino. Uma das extremidades do aldeído reage com os grupos amino do suporte, enquanto a outra extremidade reage com grupos amino laterais da proteína, formando bases de Schiff em uma larga faixa de condições, conforme esquema reacional representado na Figura 7-C (RAO *et al.*, 1998).

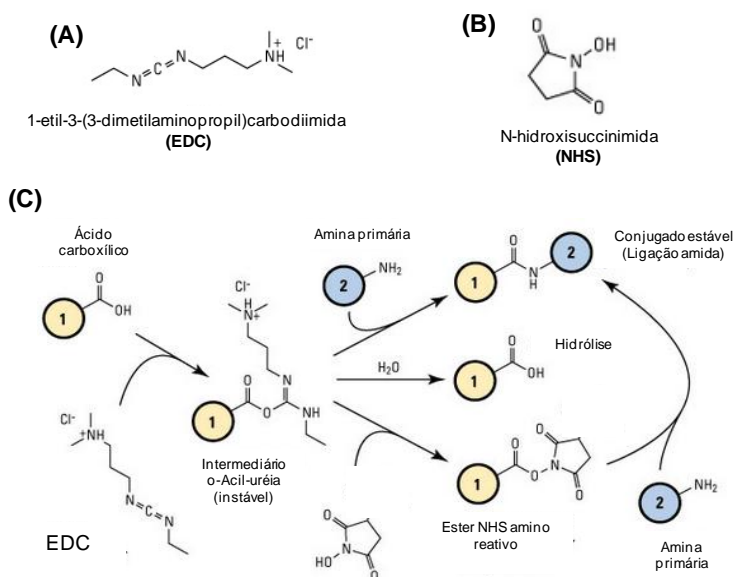
**Figura 7.** Estrutura do (A) glutaraldeído e (B) glioxal. (C) Esquema reacional do suporte aminado com uma proteína usando glioxal como reagente de ligação cruzada.



Suportes contendo grupos carboxílicos são frequentemente ativados com carbodiimidas, sendo a mais comumente empregada a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). As carbodiimidas também podem ser chamadas de reagentes de ligação cruzada de ordem zero, pois cumprem a função de ativar grupos reativos, porém não são mantidos na estrutura final após a imobilização. Duas estratégias descritas frequentemente na literatura estão representadas na Figura 8. A primeira envolve a ativação do grupo carboxílicos, formando o éster ativado o-acil-uréia, a partir desse intermediário instável três

possibilidades são apresentadas: (I) reação direta com grupo amina primária da biomolécula; (II) uma nova ativação com N-hidroxisuccinimida (NHS) formando um intermediário ativado estável à base de um éster amino reativo; (III) uma reação de hidrólise que regenera o grupo carboxílico (BOGDANOV *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2013).

**Figura 8.** (A) Estrutura do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). (B) Estrutura da N-hidroxisuccinimida (NHS). (C) Esquema reacional do EDC com NHS entre o suporte e a biomolécula (HAYWORTH, 2014).



## 1.4. CRISTAIS LÍQUIDOS

Na busca de novos materiais capazes de fornecer uma plataforma para imunodeteção, surge uma nova classe de materiais ainda pouco explorada para o desenvolvimento de imunossensores, os cristais líquidos. Essas moléculas podem ser empregadas como meio de imobilização para anticorpos, ou também podem atuar como sonda redox (quando apresentam grupos eletroativos).

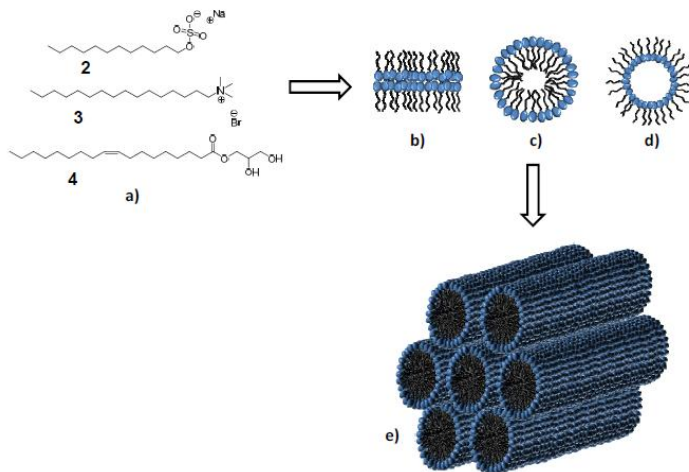
Cristal líquido (CL) é um estado da matéria entre o sólido cristalino e o líquido isotrópico, que combina organização e fluidez, apresentando propriedades interessantes e únicas, inexistentes em outros estados físicos. O que distingue o estado líquido cristalino é a tendência dessas moléculas orgânicas em apresentar uma direção comum de ordenamento em relação a um eixo, chamado de eixo diretor. Ao contrário do que ocorre com as moléculas na fase líquida, onde não há nenhuma ordem intrínseca. No estado sólido, as moléculas encontram-se altamente ordenada e têm pouca liberdade de translação. A ordem de orientação característica do estado de cristal líquido situa-se entre as fases sólida e líquida tradicionais, e esta é a origem do estado mesogênico. A auto-organização associada aos materiais líquidos cristalinos pode ser obtida através da utilização de temperatura (CL termotrópico) ou solvente (CL liotrópico) (DEMUS *et al.*, 1998; LAGERWALL e SCALIA, 2012). Em muitos casos, as moléculas podem mostrar tanto comportamento termotrópico quanto liotrópico, sendo classificado como CL anfotrópico (TSCHIERSKE, 2002).

#### **1.4.1. Classes de cristais líquidos**

Atualmente, existe uma variedade de tipos de CL, os quais se enquadram, como citado acima, em duas grandes classes: liotrópicos e os termotrópicos. A classe de CL liotrópicos possui como unidade fundamental a micela, constituída por agregados de moléculas anfifílicas, ou seja, moléculas que possuem uma região polar com características hidrofílicas e outra região extensa hidrofóbica, também denominada de cauda apolar (LAGERWALL e SCALIA, 2012). A formação das mesofases é dependente da sua concentração, como também do solvente utilizado e da temperatura da solução. Portanto, em certas condições, as micelas podem se auto-organizar formando estruturas que podem ser bastante complexas (Figura 9) (TSCHIERSKE, 2002; WESTPHAL, 2009).

No caso dos CL termotrópicos, a molécula é tomada como unidade fundamental para a ocorrência de uma mesofase, sendo que formação de mesofases é dependente apenas da temperatura. Estes, por sua vez, subdividem-se em vários grupos, dentre os quais, os mais conhecidos são os CL calamíticos e os discóticos (Figura 10).

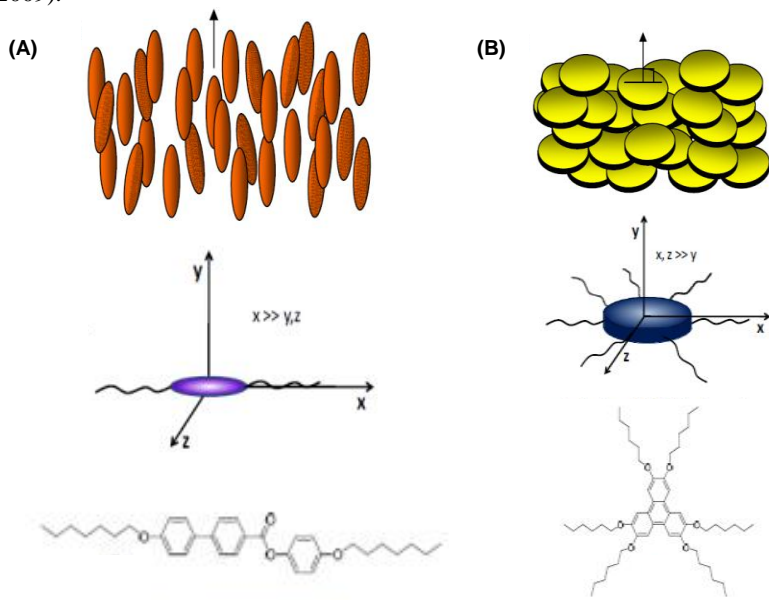
**Figura 9.** Possível arranjo estrutural de compostos anfifílicos: (a) moléculas anfifílicas formadoras de mesofase liotrópica, (b) arranjo lamelar, (c) secção de micela normal, (d) secção de micela reversa, (e) fase hexagonal (reproduzido de WESTPHAL, 2009).



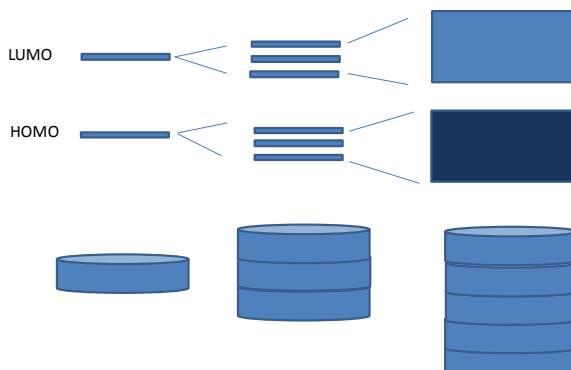
Os CL termotrópicos calamíticos, Figura 10-A, são formados por moléculas contendo um núcleo rígido alongado seguido de cadeias flexíveis, apresentando uma anisometria geométrica (eixo  $x \gg y$  e  $z$ ) similar a de uma caneta (LAGERWALL e SCALIA, 2012). Os CL termotrópicos discóticos, Figura 10-B, como o próprio nome indica possuem anisometria geométrica semelhante a um disco, onde agora os eixos  $x$  e  $z$  são muito maiores do que o eixo  $y$ . A classe discótica pode ser distribuída conforme a organização dos discos, em dois grupos: nemático (onde as moléculas encontram-se parcialmente paralelas, porém as suas posições individuais são desordenadas) e colunar (onde as moléculas encontram-se paralelamente empilhadas em colunas) (BUSHBY e LOZMAN, 2002; LAGERWALL e SCALIA, 2012).

Os cristais líquidos discóticos possuem uma auto-organização em colunas que se mantêm empacotadas, em razão de uma forte interação causada por empilhamento  $\pi$ -stacking dos orbitais, originando uma banda de condução (Figura 11), apresentando alta potencial como transportadores de cargas (ADAM *et al.*, 1994; BUSHBY e LOZMAN, 2002).

**Figura 10.** Representação esquemática de moléculas de CL em forma de (A) bastonetes e (B) de discos (adaptada de CARDOSO, 2007 e WESTPHAL, 2009).



**Figura 11.** Formação de uma banda de condução devido ao empacotamento colunar (Adaptada de LASCHAT *et al.*, 2007).



### 1.4.2. Aplicações de cristais líquidos

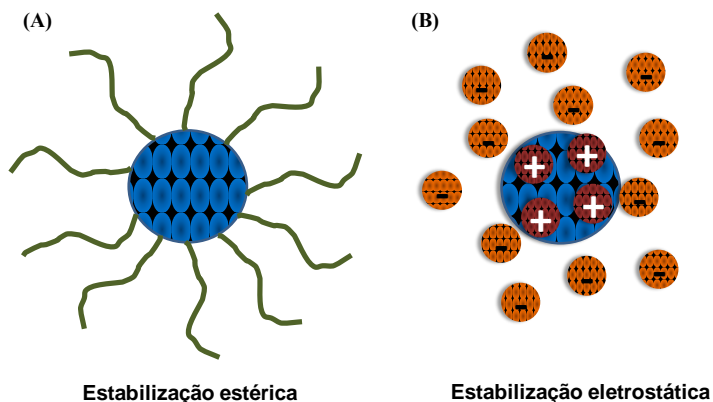
As propriedades fascinantes destes materiais mostram potencial aplicabilidade em diversas áreas e finalidades. Além da clássica aplicação em displays ópticos, os CL podem também ser aplicados em outros dispositivos eletrônicos e ópticos, no entanto, o uso desses materiais no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos ainda é praticamente inexplorado. Tais materiais podem gerar resultados interessantes e trazer vantagens para a ampliação de sensibilidade e de transdução de interações química/biológica na superfície de eletrodos, sendo aplicada, por exemplo, para o estudo de interações ligante-receptor, que ocorre na formação de imunocomplexos. Desta forma, filmes de CL eletroativos podem fornecer plataformas que operem com base nas alterações das propriedades eletroquímicas da interface do sensor e possibilitem a detecção direta da interação antígeno-anticorpo (KELLY e O'NEILL, 2000; BISOYI e KUMAR, 2010; CARLTON *et al.*, 2013).

### 1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Nanopartículas (NP) metálicas são compostos integrantes da classe dos nanomateriais, que têm suas propriedades físicas e químicas significativamente alteradas pela diminuição de tamanho (menor do que 100 nm). Essas propriedades diferem das encontradas nos mesmos materiais quando em dimensões maiores (acima de 1  $\mu\text{m}$ ) (BUZEA *et al.*, 2007). NP metálicas são utilizadas em diversas áreas, tais como, óptica (YANG *et al.*, 2007), catálise (XU *et al.*, 2009; GONÇALES-MARCIA *et al.*, 2011), bioquímica (RUSLING *et al.*, 1993; RHIEU *et al.*, 2009), medicina (SHAN *et al.*, 2008) e sensores (KHUN *et al.*, 2011). Estas aplicações requerem estratégias para evitar a formação dos aglomerados de NP metálicas e, desta forma, manter suas propriedades, tais como elevada atividade catalítica, área superficial e condutividade elétrica (HU *et al.*, 2000). Para isso é necessário a utilização de um agente estabilizante que seja capaz de evitar a coalescência e por sua vez manter o tamanho nanométrico das partículas em solução. Essa função de estabilizante pode ser desempenhada por diferentes substâncias, tais como os líquidos iônicos, surfactantes e polímeros (HU *et al.*, 2000). As moléculas do estabilizante se ligam/adsorvem sobre a superfície das NP (Figura 12), evitando a atração entre as partículas, utilizando para isso as forças repulsivas das cargas superficiais (efeito eletrostático) ou então o

impedimento estérico promovido pelas cadeias do estabilizante (efeito estérico) ou então uma combinação de ambos os efeitos (efeito eletroestérico), por exemplo, no uso de surfactantes como agentes estabilizantes (YUAN *et al.*, 2005; KHUN *et al.*, 2011).

**Figura 12.** Estabilização de nanopartículas por (A) método estérico e (B) eletrostático.

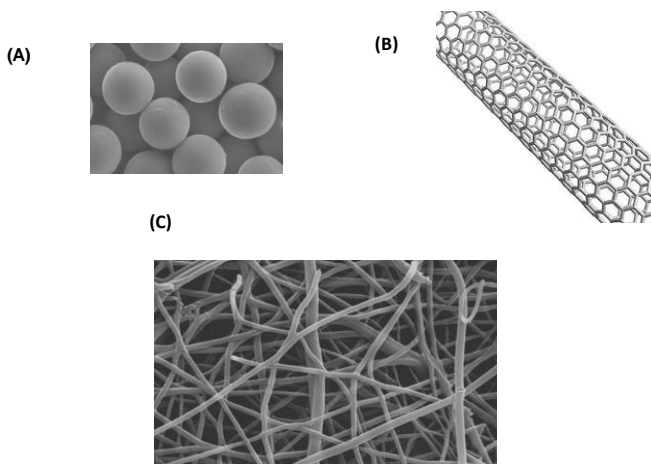


As NP metálicas, especialmente as NP de ouro (AuNP), vêm sendo empregadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos mais sensíveis e com transferência eletrônica facilitada e acelerada. Contudo, além de oferecer um mecanismo condutor em sensores, os nanomateriais também podem contribuir fornecendo uma extensa área superficial ativa frequentemente funcionalizada, a qual pode ser empregada para imobilização de importantes moléculas biorreativas como os anticorpos (KERMAN *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2002; ESCOSURA-MUÑIZ *et al.*, 2010). Neste sentido, biossensores construídos com estes nanomateriais têm apresentado resultados promissores, como aumento na sensibilidade, estabilidade e velocidade de resposta, trazendo vantagens significativas para aplicação destes dispositivos em análises clínicas (GUO e WANG, 2007; KERMAN *et al.*, 2008).

O emprego de materiais nanoestruturados para imobilização de biomoléculas e construção de biossensores tem resultado em grandes avanços em termos de estabilidade e sensibilidade (JIANRONG *et al.*, 2004; ANSARI e HUSAIN, 2012). Várias nanoestruturas têm sido

investigadas para o desenvolvimento de novos dispositivos analíticos, incluindo NP, nanotubos, nanofibras e nanofios (Figura 13) que podem fornecer um microambiente biocompatível para imobilização de biomoléculas. As NP metálicas se destacam entre as demais nanoestruturas, pois estão entre as mais extensivamente estudadas e usadas na construção de biossensores (HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2002; GUO e WANG, 2007; KERMAN *et al.*, 2008; CAMPBELL e COMPTON, 2010; WILLNER *et al.*, 2011).

**Figura 13.** Nanoestruturas frequentemente empregadas no desenvolvimento de biossensores: (A) nanopartículas, (B) nanotubos e (C) nanofios.



## 1.6. APLICAÇÃO DE IMUNOSSENSORES

A ampla versatilidade dos imunossensores, assim como a possibilidade de modificações das plataformas de detecção em busca de seletividade e confiabilidade, permite que esses dispositivos sejam aplicados na detecção de diversos agentes patogênicos, toxinas e biomarcadores para importantes doenças. A Tabela 1 apresenta alguns desses exemplos do uso de diferentes imunossensores, baseados em diferentes biomoléculas e com diferentes modos de transdução. Sendo assim, esses dispositivos permitem que esses importantes analitos sejam detectados de forma mais rápida e simples, sendo uma ferramenta útil



em muitos campos, como na área clínica, química, indústria de alimentos e análise ambiental.

**Tabela 1.** Alguns exemplos de analitos detectados com imunossensores

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Toxinas</i></b>		
Aflatoxinas	Leite	(MICHELI <i>et al.</i> , 2005)
CT	Água de rio	(LOYPRASERT <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Patogênico</i></b>		
<i>Escherichia coli</i>	Água e leite	(LI <i>et al.</i> , 2013)
<b><i>Marcadores Tumorais</i></b>		
PSA	Soro humano	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
CEA e AFP	Soro humano	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
<b><i>Biomarcadores cardíacos</i></b>		
Mioglobina	Sangue humano	(SUPRUN <i>et al.</i> , 2010)
Troponina	Sangue humano	(GOMES-FILHO <i>et al.</i> , 2013)

CT: Toxina da cólera (cholera toxin); PSA: Antígeno específico da próstata (*Prostate-specific antigen*); CEA: Antígeno carcinoembrionário (*carcinoembryonic antigen*); AFP: Alfa-fetoproteína (*alpha-fetoprotein*).

O sucesso do uso dos imunossensores, além das características de montagem e desenvolvimento da plataforma sensora está associado às particularidades de cada amostra e analito. Os avanços nessa área de pesquisa apontam para o fato de que em um futuro próximo essas novas alternativas aplicadas ao diagnóstico e tratamentos médicos tornem-se presença constante nos centros de atendimentos médicos, como por exemplo, o seu uso no diagnóstico do IAM.

## 1.7. DOENÇAS CARDÍACAS

Os atendimentos e admissões de pacientes com suspeita de doenças cardiovasculares são frequentes nos departamentos de emergência médica, sendo uma das principais causas de mortalidade mundial (MENDIS *et al.*, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de

doenças cardiovasculares em 2008, representando 30% de todas as mortes globais (WHO, 2011). Segundo projeções da OMS, em 2030 quase 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares, principalmente por infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, permanecendo como as principais causas de mortalidade (WHO, 2011; MANSUR e FAVARATO, 2012).

No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no país, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos adultos. Os sintomas de diferentes síndromes coronarianas agudas são muito semelhantes, incluindo dor no peito, falta de ar e/ou náuseas. Como o tratamento para cada condição anterior é diferente, e a maioria deles exige medidas urgentes, é imperativo que os médicos disponham de informações adicionais em um curto período de tempo, permitindo-lhes efetuar um diagnóstico rápido e preciso (MOREIRA *et al.*, 2011). Atualmente, a investigação eletrocardiográfica associada à sintomatologia clínica tem sido o principal método utilizado para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM), entretanto um percentual significativo de pacientes infartados não apresentam alterações no eletrocardiograma. Em vista disso, o emprego dos marcadores cardíacos no diagnóstico do IAM assume importância primordial para estratificação do risco e prognóstico dos pacientes (SUPRUN *et al.*, 2010).

### **1.7.1. Biomarcadores cardíacos**

Biomarcadores são substâncias específicas de um órgão ou tecido sob investigação, que são sintetizadas ou secretadas proporcionalmente à injúria ou doença que o está acometendo. Biomarcadores cardíacos são, em geral, proteínas liberadas no sangue quando há lesão ao músculo cardíaco. Mioglobina (Mb), troponinas I e T, e creatina fosfoquinase (*creatine phosphokinase* – CPK) são os marcadores mais conhecidos e aplicados para detecção de lesões cardíacas. A quantidade destas proteínas aumenta no soro sanguíneo após o IAM, e a sua rápida determinação, sob condições fisiológicas agudas, é de fundamental importância para a sobrevivência do paciente (OYAMA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2011).

A CK-MB é uma isoenzima liberada pelo músculo cardíaco. Esta enzima eleva-se quando ocorre isquemia em uma determinada região do músculo cardíaco, atingindo o auge entre 12 e 24 horas. Apesar de a CK-MB total ser um marcador sensível de lesão ao miocárdio, têm baixa especificidade devido à sua alta concentração no

músculo esquelético (QURESHI *et al.*, 2012; TEIXEIRA e BORGES, 2012).

A Mb é uma molécula de proteína relativamente pequena, a qual é liberada para o sangue até uma hora após o infarto agudo do miocárdio, atingindo um pico de 4 a 12 horas, sendo em seguida rapidamente eliminada. A principal vantagem de utilizar a Mb como um marcador cardíaco é que essa proteína é liberada mais rapidamente a partir de células danificadas do que outros marcadores cardíacos, permitindo a detecção precoce do IAM (LEWANDROWSKI *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2011).

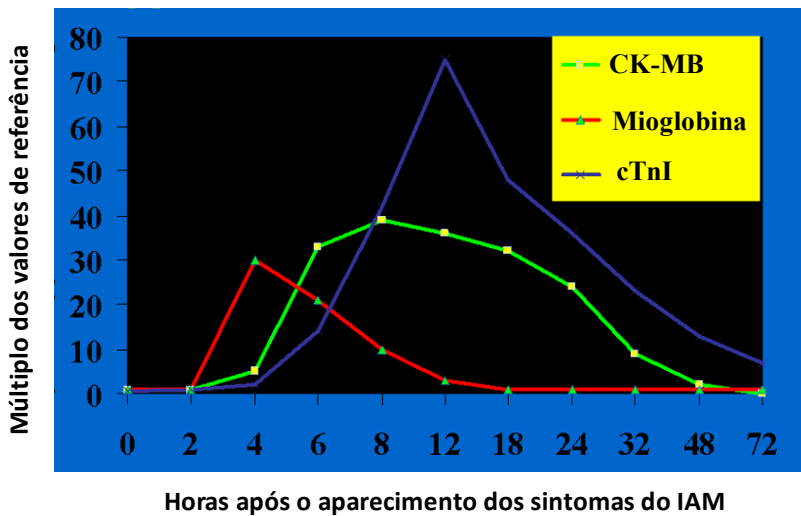
A troponina é um complexo de três proteínas (troponina I, troponina C e troponina T) que regula a contração dos músculos esquelético e cardíaco. As troponinas cardíacas I (cTnI) e T (cTnT) têm sido investigadas como importantes biomarcadores para diagnóstico de lesão cardíaca, devido a sua elevada especificidade. Já a troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como no cardíaco, sendo, portanto, pouco útil para o diagnóstico de dano ao músculo cardíaco (ARCHER, 2003; LEWANDROWSKI *et al.*, 2002).

Os níveis normais de cTnT e cTnI são indetectáveis no sangue pelos métodos disponíveis na atualidade, de forma que os valores de referência destas proteínas são adotados como zero. Após o IAM, inicia-se a liberação na circulação destas troponinas, apresentando níveis detectáveis cerca de 12 horas ou menos após o evento, utilizando as metodologias disponíveis em hospitais e unidades de pronto-atendimento (LEWANDROWSKI *et al.*, 2002; ARCHER, 2003).

A Figura 14 apresenta a variação nas concentrações em função do tempo dos principais biomarcadores liberados na corrente sanguínea após o início dos primeiros sintomas do IAM. Como se pode observar, cada marcador apresenta um pico de concentração característico que é medido em relação a valores em indivíduos saudáveis.

Vários métodos de detecção de biomarcadores cardíacos, empregados para o diagnóstico de IAM, têm sido descritos na literatura, incluindo imunoenaios com eletroquimioluminescência, ensaios imunoenzimáticos, radioimunoenaios e testes imunocromatográficos (CAVALCANTI *et al.*, 2011). Contudo, muitos destes métodos requerem elevado tempo e custo para execução das análises. Neste contexto, o emprego de imunossensor que possa detectar e quantificar o teor desses marcadores cardíacos, em poucos minutos, irá garantir um diagnóstico em tempo real, visto que, o paciente que sofreu um IAM deve ser diagnosticado precocemente para um melhor prognóstico (QURESHI *et al.*, 2012).

**Figura 14.** Concentração dos biomarcadores cardíacos, em função dos níveis de referência para um indivíduo relativa saudável, em função do tempo após o infarto (Adaptada de MCCORD, 2011).



## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver novos imunossensores à base de filmes de cristais líquidos e nanopartículas de ouro para detecção de biomarcadores cardíacos (Mb, cTnT e cTnI).

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.2.1. Imunossensor *label-free* à base de AuNP estabilizadas em polietilenoimina (PEI) e CL como sonda redox para detecção de Mb**

- Formação de filmes de CL à base de brometo de (E)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio (Br-Py) sobre um eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* – GCE);
- Funcionalização superficial da plataforma de Br-Py/GCE empregando AuNP estabilizadas em PEI (AuNP-PEI);
- Imobilização dos anticorpos anti-mioglobina (ab-Mb) através de ligação covalente com glicoxal sobre a superfície funcionalizada;
- Caracterização eletroquímica das plataformas através de medidas de CV, SWV e EIS;
- Caracterização morfológica das superfícies desenvolvidas através de microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* – SEM);
- Otimização do imunossensor através de técnicas eletroquímicas, investigando diversos parâmetros, tais como: quantidade de Br-Py, quantidade de AuNP-PEI, pH do eletrólito suporte, tempo de incubação e parâmetros voltamétricos;
- Estudo de compostos possivelmente interferentes e estabilidade;
- Construção de uma curva de calibração para cTnT;
- Aplicação do imunossensor na detecção de Mb em amostras de soro simulado.

#### **2.2.2. Imunossensor *label-free* à base de AuNP estabilizadas em silsesquioxano (Sil) e CL como sonda redox para detecção de cTnT**

- Formação de filmes de CL à base de Br-Py sobre um GCE;
- Funcionalização superficial da plataforma de Br-Py/GCE empregando AuNP estabilizadas em Sil (AuNP-Sil);
- Imobilização dos anticorpos anti-troponina T cardíaca (ab-cTnT) através de interação eletrostática sobre a superfície funcionalizada;

- Caracterização eletroquímica das plataformas através de medidas de CV, SWV e EIS;
- Caracterização morfológica das superfícies desenvolvidas através de SEM;
- Otimização do imunossensor através de técnicas eletroquímicas, investigando diversos parâmetros, tais como: quantidade de Br-Py, quantidade de AuNP-Sil, pH do eletrólito suporte, tempo de incubação e parâmetros voltamétricos;
- Construção de uma curva de calibração para cTnT;
- Estudo de reprodutibilidade e estabilidade;
- Estudo de compostos possivelmente interferentes;
- Aplicação do imunossensor na detecção de cTnT em amostras de soro simulado e plasma sanguíneo humano.

### **2.2.3. Imunossensor *label-free* à base de CL colunar e AuNP estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina (PAH) para detecção de cTnI**

- Formação de filmes de CL colunar à base do derivado de 1,3,4-oxadiazol ( $CL_{col}$ ) sobre um GCE;
- Avaliação do efeito do aquecimento na organização do filme de  $CL_{col}$  sobre GCE;
- Funcionalização superficial da plataforma  $CL_{col}$ /GCE empregando AuNP estabilizadas em PAH (AuNP-PAH);
- Imobilização dos anticorpos anti-troponina I cardíaca (ab-cTnI) através de ligação covalente sobre a superfície funcionalizada;
- Caracterização morfológica das superfícies desenvolvidas através de microscopia óptica com luz polarizada (*polarized optical microscopy* – POM);
- Caracterização eletroquímica das plataformas através de medidas de CV e EIS;
- Otimização do imunossensor através de técnicas eletroquímicas, investigando diversos parâmetros, tais como: quantidade de  $CL_{col}$ , quantidade de AuNP-PAH, técnica eletroquímica, efeito da velocidade de varredura, imobilização do ab-cTnI, constante de associação e tempo de incubação.
- Estudo de compostos possivelmente interferentes e reprodutibilidade;
- Construção de uma curva de calibração para cTnI;
- Aplicação do imunossensor na detecção de cTnI em amostras de soro simulado e plasma sanguíneo humano.

## **CAPÍTULO 3. METODOLOGIA**

### **3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES**

Os anticorpos anti mioglobina (ab-Mb), anti troponina T (ab-cTnT), anti troponina I (ab-cTnI) e os respectivos antígenos Mb, cTnT e cTnI foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ácido ascórbico, albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA), ácido cítrico, creatinina, creatina, glicina, glicose, lisina, ácido úrico, dopamina, ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio foram adquiridos também da Sigma-Aldrich. Todos os reagentes empregados possuíam grau analítico e foram usados sem qualquer purificação adicional. Água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), com uma resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , foi utilizada na preparação de todas as soluções aquosas.

O tampão fosfato salino (PBS) ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5), utilizado como o eletrólito de suporte, foi preparado por dissolução de KCl, NaCl, e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em água ultrapura, e o valor do pH foi ajustado com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio.

As soluções dos agentes reticulantes: glioxal (Fluka), EDC (Sigma-Aldrich) e NHS (Sigma-Aldrich), foram preparadas em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5), nas concentrações de 2,5%, (m/v),  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

#### **3.1.1. Amostras**

O soro simulado (adaptado a partir de KREBS, 1950) foi preparado usando uma solução de PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5), com a adição de ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), BSA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatinina ( $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatina ( $10,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), glicina ( $17,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), glicose ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), lisina ( $29,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido úrico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Para os estudos com o imunossensor para Mb foram preparadas amostras em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo 35, 45 e  $55 \text{ ng mL}^{-1}$  de Mb ou soro simulado contendo 10, 20 e  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  de Mb.

Para os estudos com o imunossensor para cTnT foram preparadas amostras de soro simulado contendo  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  de cTnT. Amostras de plasma sanguíneo humano (obtido da Sigma-Aldrich, na forma liofilizada) também foram preparadas contendo  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  de cTnT.

Para os estudos com o imunossensor para cTnI foram preparadas amostras de plasma sanguíneo humano (obtido a partir da Sigma-Aldrich), com a adição de 0,05 ou 0,1 ng mL<sup>-1</sup> de cTnI.

### 3.1.2. Moléculas de CL e sondas eletroquímicas

O CL Br-Py foi sintetizado e caracterizado segundo metodologia descrita no trabalho publicado por Zapp e colaboradores (2014A). Este CL foi empregado como sonda redox para os estudos com os imunossensores para Mb e cTnT.

As moléculas de CL<sub>col</sub> foram sintetizadas e caracterizadas segundo metodologia descrita por Girotto e colaboradores (2014).

Ambas as moléculas de CL foram sintetizadas pelo Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Hugo Gallardo, e fornecidas para o presente trabalho de forma colaborativa.

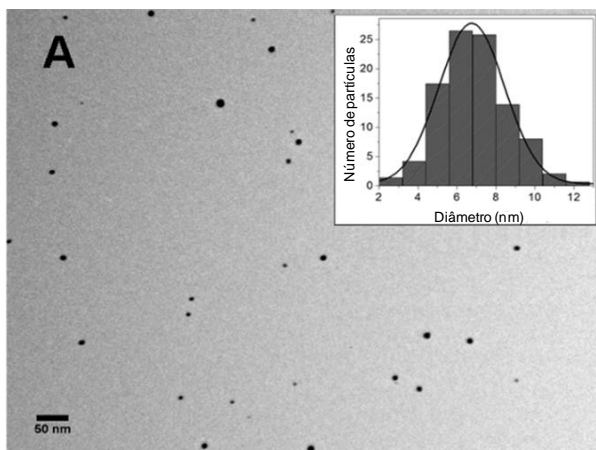
Para os estudos com o imunossensor para cTnI empregou-se como sonda redox uma solução de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, preparada em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5).

### 3.1.3. Síntese e caracterização das AuNP

As AuNP estabilizadas em PEI (AuNP-PEI) foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC – UFSC) pelo Dr. Bernardo de Souza, com a contribuição do Dr. Bruno Silveira de Souza (na caracterização microscópica realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC)), e fornecidas para o presente trabalho de forma colaborativa. AuNP-PEI foram sintetizadas conforme metodologia descrita no trabalho publicado por Brondani e colaboradores (2013), utilizando uma solução de ácido tetracloreáurico (HAuCl<sub>4</sub>) e PEI ramificada (massa molar de 25 kDa) sob uma rampa de aquecimento até o aparecimento de uma cor vermelha rubi característica. As AuNP-PEI caracterizadas por TEM apresentaram um diâmetro médio de 8,5±2,3 nm (Figura 15).



**Figura 15.** Imagens de TEM para AuNP estabilizada em PEI. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula do com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de BRONDANI *et al.*, 2013).

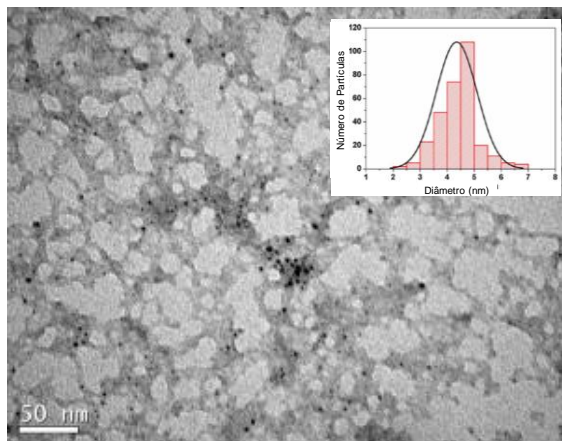


As AuNP estabilizadas em material híbrido, cloreto de 3-n-propil-4-picolínio silsesquioxano, (AuNP-Sil) foram sintetizadas pelo doutorando Paulo Sérgio Silva no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA-UFSC) coordenado pelo Prof. Dr. Almir Spinelli, e fornecidas para o presente trabalho de forma colaborativa. Para a síntese das AuNP-Sil, descrita por Silva e colaboradores (2014A), 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados a 2,5 mL de uma solução aquosa de silsesquioxano (2 g  $\text{L}^{-1}$ ), sendo a mistura mantida sob agitação. Após 5 min, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de borohidreto de sódio (20 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) recentemente preparada foi adicionada rapidamente. Depois de 60 s a solução mudou de incolor para vermelho, indicando a formação de AuNP. As partículas foram obtidas com forma esférica e um diâmetro médio de  $5,0 \pm 0,2$  nm, determinado por análise de TEM (Figura 16).

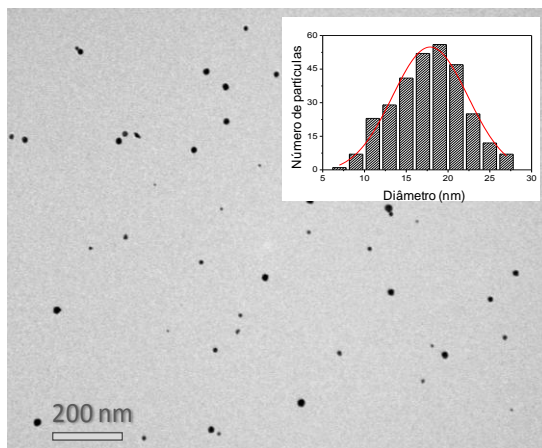
As AuNP estabilizadas em PAH (AuNP-PAH) foram sintetizadas de acordo com o procedimento descrito por SILVA *et al.* (2014B). Para a síntese, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) foi adicionada a 10,0 mL de uma solução de PAH (0,25%, m/v), sob agitação mecânica. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de  $\text{NaBH}_4$  (0,02 mol  $\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados de uma só vez, mantendo a agitação mecânica até a “solução” tornar-se vermelha, indicando a formação de AuNP. As partículas obtidas foram

caracterizadas por TEM, apresentando formato esférico e um diâmetro médio de  $17,8 \pm 0,3$  nm (Figura 17).

**Figura 16.** Imagens de TEM para AuNP estabilizadas em Sil. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de SILVA *et al.*, 2014A).



**Figura 17.** Imagens de TEM para AuNP estabilizadas em PAH. Inserido: histograma de distribuição de tamanho de partícula do com base em cerca de 300 partículas (reproduzido de SILVA *et al.*, 2014B).



## 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

As medidas de CV, SWV e EIS foram realizados usando um potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128N (Eco Chemie, The Netherlands) com módulo FRA acoplado. Para todas as medidas empregou-se um sistema de três eletrodos: um GCE (diâmetro  $2,0 \pm 0,1$  mm, produzido pela Metrohm Autolab) foi modificado para obtenção dos imunossensores propostos e empregado como eletrodo de trabalho, uma placa de platina (aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$ ) foi usada como contra-eletrodo e um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl ( $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) como eletrodo de referência, contra o qual todos os potenciais aqui relatados foram medidos.

As imagens de SEM foram realizadas usando um microscópio da JEOL JSM-6701 com canhão de emissão de campo (*field emission gun* – FEG) como detector, operando com voltagem de aceleração de 10 kV. As suspensões de AuNP foram depositadas numa grade de cobre revestida com carbono e analisadas usando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-2100, operando a 100 kV. Ambos os tipos de microscopia foram realizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC, Florianópolis, Brasil). As medidas de potencial zeta de AuNP-Sil e ab-cTnT/AuNP-Sil foram obtidas utilizando um instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) localizado no Departamento de Química da UFSC, de caráter multiusuário.

Microscopias ópticas com luz polarizada (POM) foram realizadas em um microscópio óptico da marca Leica modelo DM4500 P (utilizando o software IM50 para a aquisição de dados), localizado no Departamento de Física da UFSC e de caráter multiusuário.

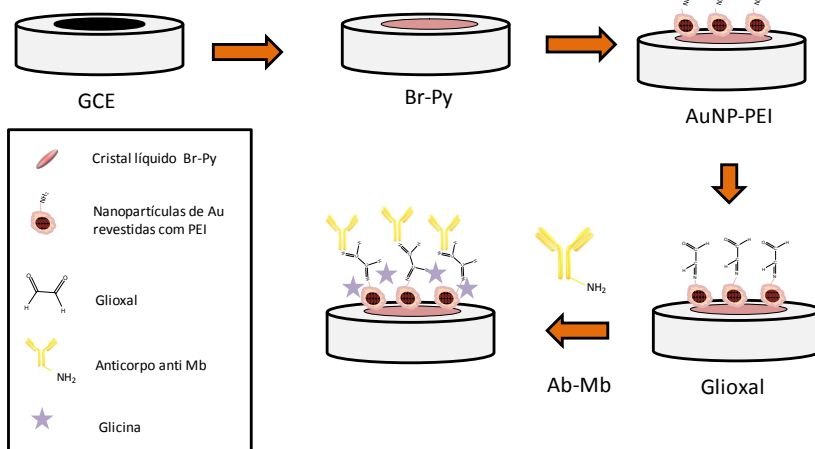
## 3.3. PREPARAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES

### 3.3.1. Montagem do imunossensor para Mb

As etapas empregadas na construção do imunossensor para Mb estão representadas na Figura 18. Inicialmente, a superfície do GCE passou por um pré-tratamento mecânico, que consistiu no polimento manual com suspensão de alumina ( $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ ), utilizando tecido de polimento (feltro) como base para fricção. O polimento foi realizado fazendo-se movimentos em forma de “oito” durante cerca de 2 min. Para remover as partículas de alumina residual da superfície do GCE, o mesmo foi lavado com água desionizada e mantido em banho de

ultrassom com água desionizada durante 10 min. Após essa etapa de pré-tratamento, uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  de solução de Br-Py ( $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foi gotejada sobre a superfície do GCE limpo, e em seguida o mesmo foi deixado ao ar em temperatura ambiente para que o solvente evaporasse, formando um filme fino e sólido sobre o eletrodo. Em um segundo passo, uma suspensão aquosa de AuNP-PEI foi gotejada sobre a superfície do eletrodo Br-Py/GCE, sendo este colocado em um dessecador sob vácuo e mantido até a completa evaporação do solvente (cerca de 10 min). Então, o eletrodo foi incubado com 3  $\mu\text{L}$  de ab-Mb ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e 3  $\mu\text{L}$  de glicoxal (2,5%, m/v) (reagente de “cross-linking”). Após 30 min, o eletrodo foi lavado com PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) para remover as moléculas de anticorpo não imobilizados. Finalmente, para evitar ligações indesejadas na superfície o imunossensor foi incubado com 3  $\mu\text{L}$  de glicina ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) durante 15 min.

**Figura 18.** Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de Br-Py sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-PEI. 3. Ativação dos grupos amino do polímero com glicoxal e imobilização covalente das moléculas de ab-Mb. 4. Bloqueio da superfície com glicina.

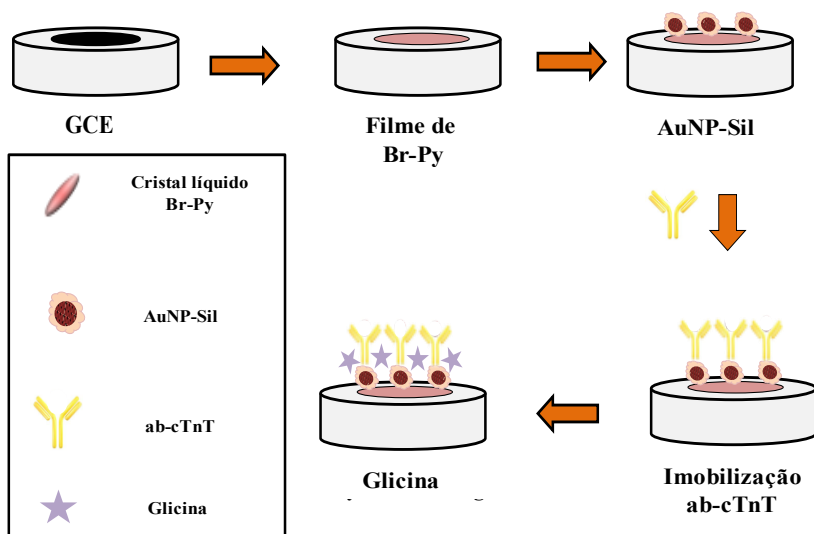


### 3.3.2. Montagem do imunossensor para cTnT

As etapas empregadas na construção do imunossensor para cTnT estão representadas na Figura 19. Após o pré-tratamento da superfície do GCE, como descrito anteriormente, iniciou-se a montagem

do imunossensor. Para isso, gotejou-se 3  $\mu\text{L}$  de uma solução de Br-Py ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) sobre o GCE, e o solvente foi evaporado ao ar em temperatura ambiente. Em um segundo passo, uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  da suspensão de AuNP-Sil foi gotejada sobre a superfície do eletrodo, e o solvente foi evaporado sob vácuo. Então, o eletrodo foi incubado com 3  $\mu\text{L}$  de ab-cTnT ( $150 \text{ ng mL}^{-1}$ ) por 30 min, e, em seguida, foi lavado com PBS para remover as moléculas de anticorpo não immobilizadas. Posteriormente, o imunossensor foi incubado com 3  $\mu\text{L}$  de glicina ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) para bloquear a superfície do imunossensor evitando ligações indesejadas.

**Figura 19.** Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de Br-Py sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-Sil. 3. Imobilização das moléculas de ab-cTnT por adsorção. 4. Bloqueio da superfície com glicina.



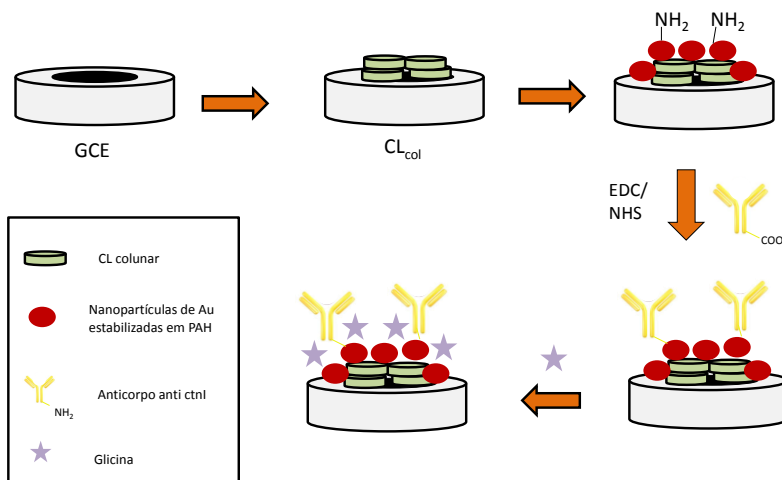
### 3.3.3. Montagem do imunossensor para cTnI

As etapas empregadas na construção do imunossensor para cTnI estão representadas na Figura 20. Inicialmente, soluções de EDC ( $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e NHS ( $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas para ativação do anticorpo ab-cTnI. Em um microtubo tipo *Eppendorf*, misturou-se as

soluções de EDC, NHS e ab-cTnI ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ), em uma razão 1:1:1 (em volume), e a solução resultante foi mantida à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 45 min.

Paralelamente, iniciou-se o processo de montagem do imunossensor. Sobre a superfície de um GCE previamente limpo (conforme descrito anteriormente),  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{CL}_{\text{col}}$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foram gotejados, e o solvente foi deixado evaporar ao ar em temperatura ambiente. Após a formação do filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$ , o eletrodo foi submetido a um tratamento térmico em estufa ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min), sendo em seguida mantido à temperatura ambiente para resfriamento e organização do filme, durante 15 min. Em uma segunda etapa, uma suspensão de AuNP-PAH foi gotejada sobre a superfície do eletrodo, e o solvente foi evaporado sob vácuo. Em seguida, uma alíquota de  $3 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de ab-cTnI ativado previamente com EDC/NHS foi gotejada sobre a superfície do eletrodo. Após 30 min, a superfície do eletrodo foi lavada com PBS para remover as moléculas de anticorpo não imobilizadas. Posteriormente, o imunossensor foi então incubado com  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de glicina ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), durante 15 min, para bloquear a superfície do eletrodo.

**Figura 20.** Etapas de montagem do imunossensor: 1. Deposição do filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$  sobre uma superfície de um GCE limpo. 2. Deposição do filme de AuNP-PAH. 3. Imobilização covalente das moléculas de ab-cTnI usando EDC/NHS. 4. Bloqueio da superfície com glicina.



## **CAPÍTULO 4. IMUNOSSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLIETILENOIMINA PARA DETECÇÃO DE MIOGLOBINA**

*Publicado em: Biosensors and Bioelectronics, 59, 127–133, 2013.*

*(Fator de impacto 2014: 6,451)*

### **Resumo:**

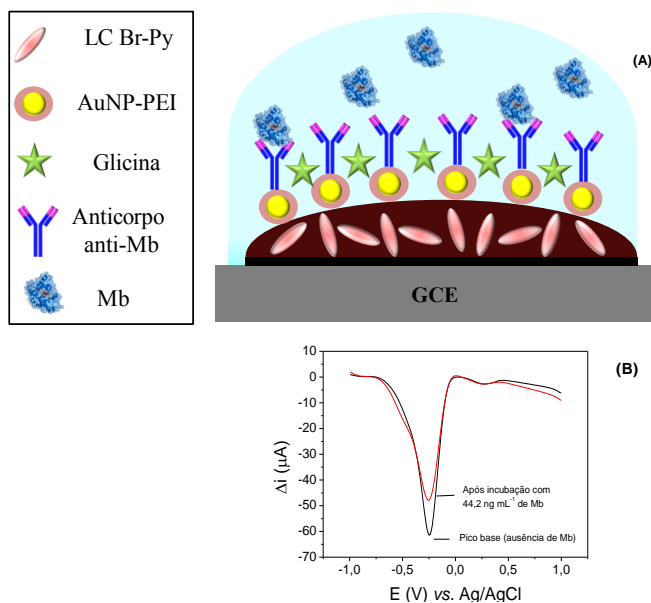
*Este capítulo apresenta os resultados e discussões referentes ao imunossensor eletroquímico não marcado para detecção de Mb. O imunossensor baseia-se em um filme do cristal líquido Br-Py e AuNP-PEI sobre a superfície de um GCE. Sobre o filme de AuNP-PEI foram imobilizadas covalentemente moléculas do anticorpo monoclonal ab-Mb. O método proposto baseia-se na supressão voltamétrica do sinal da sonda Br-Py após incubação do imunossensor com o antígeno Mb.*

## 4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.1. Princípio de funcionamento do imunossensor

A Figura 21-A mostra uma representação esquemática da estrutura da modificação do GCE por moléculas de Br-Py, AuNP-PEI, ab-Mb e glicina. A Figura 21-B mostra o perfil da resposta voltamétrica do imunossensor na ausência (apenas PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5)) e na presença de 44,2 ng mL<sup>-1</sup> de Mb. Inicialmente, uma medida voltamétrica foi realizada utilizando o imunossensor em solução de PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) para se obter o pico base (referente à redução do grupo azo da molécula de CL imobilizada sobre o sensor), na ausência de Mb. Subsequentemente, o imunossensor foi incubado com 3 μL de solução Mb preparada em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), durante 10 min. Após cada passo do imunoensaio, a superfície do sensor foi exaustivamente lavada com PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), e um segundo voltamograma foi obtido. O grau de inibição do pico está correlacionado com a quantidade de Mb presente na solução analisada.

**Figura 21.** (A) Representação esquemática da superfície do imunossensor à base de Br-Py. (B) Resposta voltamétrica em solução de PBS (pico base) e resposta após incubação em 44,2 ng mL<sup>-1</sup> de Mb.

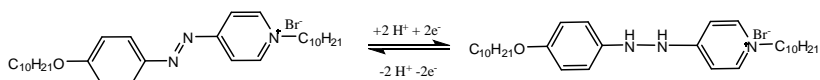




#### 4.1.2. Comportamento eletroquímico do sensor Br-Py

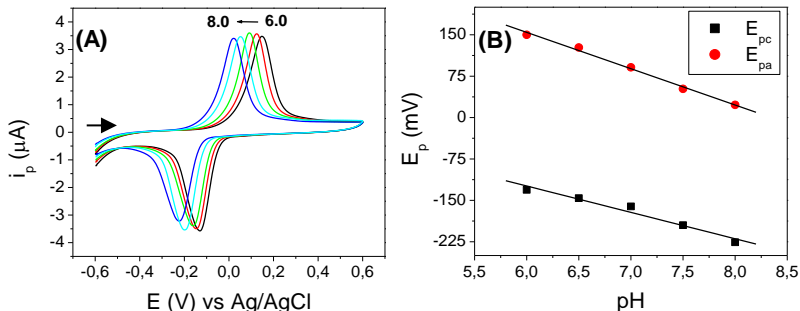
Um par de picos redox pode ser observado quando o eletrodo modificado com Br-Py foi submetido a uma variação de potencial no intervalo de -0,6 V a 0,6 V utilizando a CV. O sinal observado está associado ao grupo azo conjugado com os heterociclos da estrutura da molécula Br-Py (Figura 22) (XIA *et al.*, 1996; EL-ATTAR *et al.*, 2012).

**Figura 22.** Proposta de reação de redução/oxidação para a molécula de Br-Py.



O efeito do pH no processo eletroquímico do sensor Br-Py também foi investigado. Os voltamogramas cíclicos para o sensor com o filme de Br-Py foram obtidos em diferentes valores de pH (PBS, pH 6,0–8,0) a uma velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> (Figura 23-A). Os valores para E<sub>pa</sub> e E<sub>pc</sub> deslocaram-se negativamente e de forma linear com o aumento do pH da solução, o que implica que o processo eletroquímico se realiza com uma possível transferência de prótons. Os gráficos de E<sub>pa</sub> e E<sub>pc</sub> *versus* pH (6,0–8,0) (Figura 23-B) revelam uma relação linear com coeficientes angulares de -65,8 mV pH<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,997) e -47,8 mV pH<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,996), respectivamente, que se aproximam do valor esperado de -59,2 mV pH<sup>-1</sup> (a 25 °C) para um processo reversível. Assim, estes resultados sugerem que a mesma quantidade de prótons e elétrons participam da reação eletroquímica do sensor modificado com Br-Py (BARD e FAULKNER, 2001; EL-ATTAR *et al.*, 2012; BRONDANI *et al.*, 2013).

**Figura 23.** (A) Voltamogramas cíclicos para o efeito da variação do pH (6–8) em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) sobre a resposta do eletrodo modificado com Br-Py a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Variação dos potenciais de pico com o pH.

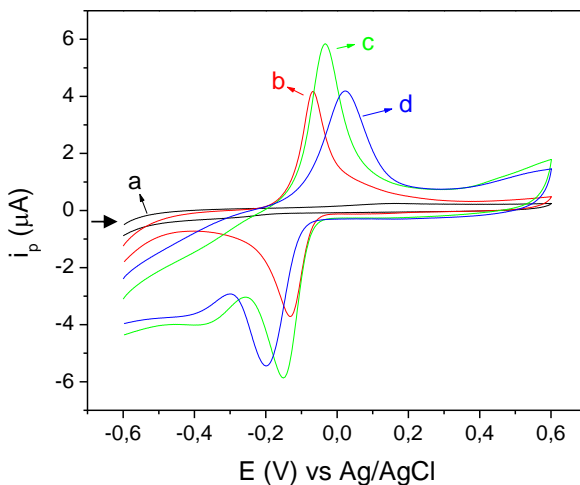


A Figura 24 mostra os voltamogramas cíclicos para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5). Como esperado, o GCE não modificado, voltamograma “a”, não mostra nenhum pico redox. Por conseguinte, o pico redox observado para o sensor “b” pode ser atribuído à molécula iônica Br-Py, como sugerido anteriormente.

As moléculas de anticorpo necessitam de uma superfície ativa para serem fixadas através de ligações covalentes pelo emprego de reagentes funcionais, neste trabalho empregou-se o glioxal (RUSMINI *et al.*, 2007). Com essa finalidade, um filme de AuNP-PEI foi formado sobre a plataforma de Br-Py/GCE, resultando em uma superfície com grupos amino disponíveis, provenientes da PEI. Para tal etapa, uma alíquota ( $3 \mu\text{L}$ ) das AuNP-PEI foi depositada (por gotejamento) sobre a superfície do eletrodo previamente modificado com a sonda Br-Py. Após evaporação do solvente à temperatura ambiente em dessecador sob vácuo, o sensor AuNP-PEI/Br-Py/GCE foi submetido a uma medida de CV. Como mostrado na Figura 24 (voltamograma “c”), o eletrodo modificado com AuNP-PEI mostrou um aumento na corrente de pico de 41,5% em relação ao sinal de Br-Py (voltamograma b), aumentando a transferência eletrônica associado ao aumento de área superficial conferido por AuNP-PEI (LI *et al.*, 2010. A estratégia empregada para imobilização do anticorpo ab-Mb foi a ligação covalente, empregando os grupos aminos residuais das cadeias do anticorpo e os grupos amino

da PEI do segundo filme (AuNP-PEI). Após a imobilização de ab-Mb, o imunossensor também foi submetido a uma medida de CV. Como pode ser visto no voltamograma “d” (Figura 24), a imobilização de moléculas de proteína causou uma diminuição no pico redox, cerca de 28,5 % menor que a corrente obtida para o voltamograma “c” e também um deslocamento do pico para potenciais mais positivos, o que é atribuído à natureza isolante da proteína, tornando o processo de transferência eletrônico cineticamente mais lento e termodinamicamente menos favorável (MENDES et al., 2009). Esta inibição pode ser utilizada para monitorar eventos específicos sobre a superfície do sensor, tais como a ligação do antígeno, sendo, portanto essa a estratégia empregada para o desenvolvimento do imunossensor *label-free*.

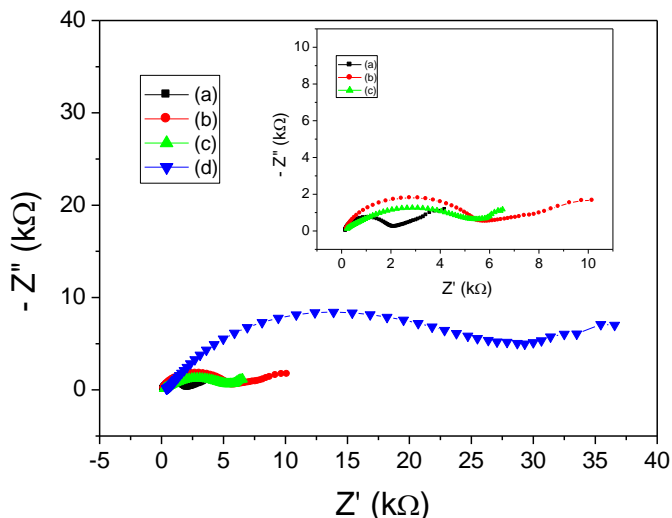
**Figura 24.** Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para: (a) GCE, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5).



Medidas de EIS também foram realizadas a fim de se obter informação sobre a interface dos diferentes sensores, incluindo: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE. A Figura 25 mostra os diagramas de Nyquist ( $-Z''$  vs.  $Z'$ ) obtidos para cada sensor imerso em solução de KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Os diagramas de

Nyquist foram ajustados ao modelo de circuito de Randles, que inclui a resistência ôhmica da solução de eletrólito ( $R_s$ ), a impedância de Warburg ( $Z_w$ ), a capacitância de dupla camada ( $C_{dl}$ ) e a  $R_{ct}$  (CRISTIANO *et al.*, 2012). Como pode ser observado na Figura 25, com exceção do eletrodo “c” todos os passos de modificação promovem um aumento na  $R_{ct}$  dos eletrodos, usando o GCE não modificado como valor de comparação, os valores de  $R_{ct}$  obtidos foram: GCE (1700  $\Omega$ ), Br-Py/GCE (4700  $\Omega$ ), AuNP-PEI/Br-Py/GCE (5600  $\Omega$ ) e ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE (28200  $\Omega$ ). A deposição do filme de Br-Py gera um aumento de  $R_{ct}$ , isso se dá pelo fato de que, embora a molécula Br-Py possua um centro redox baseado no grupo azo, essa molécula também apresenta duas cadeias alifáticas contendo dez átomos de carbono em cada extremidade, o que confere um caráter isolante para essa região da molécula e portanto para o filme também. A diminuição na  $R_{ct}$  mostrada pelo sensor “c” (contendo AuNP-PEI) corrobora o comportamento voltamétrico do sensor (Figura 24-c) que apresenta um aumento no pico de corrente, ou seja, uma menor resistência no eletrodo, sendo portanto o eletrodo mais condutor, promove um aumento da taxa de transferência eletrônica, como mostrado no voltamograma “c” da Figura 24. O grande aumento na  $R_{ct}$  observado na Figura 25-d é uma evidência de que as moléculas de anticorpo foram imobilizadas no filme de AuNP-PEI, como discutido anteriormente a proteína apresenta propriedades isolantes, e quando imobilizadas sobre o eletrodo causam um bloqueio da superfície tornando o eletrodo menos condutor, que reflete em uma maior  $R_{ct}$ , e uma diminuição do sinal voltamétrico quando comparado com o sensor “c”.

**Figura 25.** Diagramas de Nyquist para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (d) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE em solução de KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz. Inserido: (a) GCE não modificado (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-PEI/Br-Py/GCE.

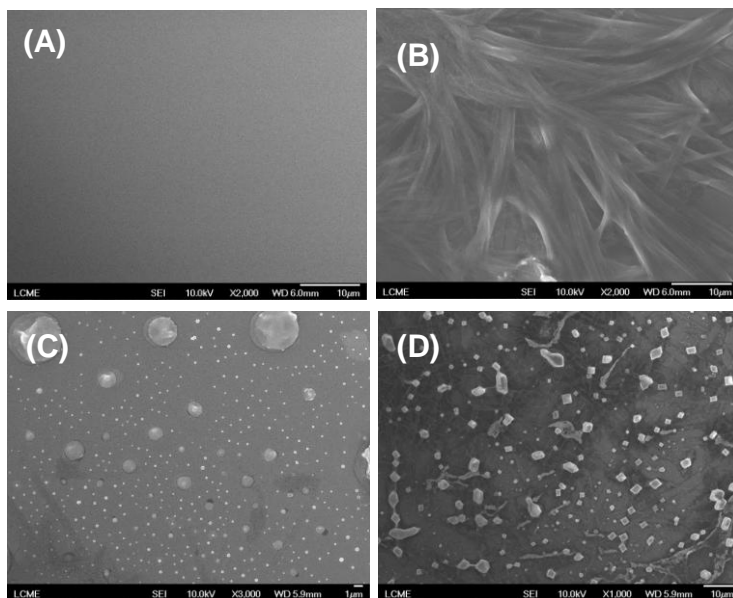


#### 4.1.3. Imagens da superfície dos sensores

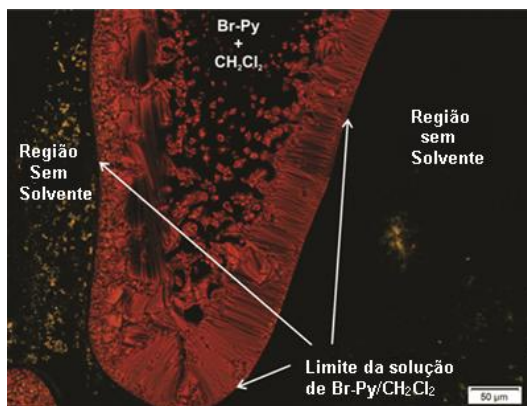
A Figura 26 mostra imagens das superfícies dos sensores obtidas por SEM-FEG, incluindo (A) GCE não modificado, (B) Br-Py/GCE, (C) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (D) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE. A Figura 26-B mostra o recobrimento completo da superfície do eletrodo por um filme perfeitamente homogêneo de Br-Py, que apresenta uma textura tipo fibra. É possível que esta textura semelhante à fibra esteja relacionada com uma auto-organização molecular do Br-Py em uma mesofase liotrópica durante a evaporação do diclorometano. Com a evaporação do solvente, o aumento de concentração de Br-Py ocorre continuamente até que alguma concentração crítica é atingida, onde estes agregados liotrópicos são formados (ZAPP *et al.*, 2014B). Análise preliminar com POM utilizando gotas concentradas de Br-Py em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Figura 27) corroboram com estes resultados. A presença de uma textura na solução Br-Py +  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  é um forte indício da formação de uma mesofase liotrópica. A ausência de cristais na região da solução foi confirmada por cisalhamento/compressão suave das duas placas de

vidro, o que demonstra a fluidez da solução e da textura. É importante notar que na ausência de solvente a textura líquido-cristalina é apenas observada entre 117 e 134 °C por aquecimento, e entre 133 e 114 °C, durante o arrefecimento. Na Figura 26-C é possível observar os domínios de AuNP-PEI (pontos brilhantes) distribuídos homogeneamente sobre o filme de Br-Py. A Figura 26-D apresenta uma alteração da forma dos pontos brilhantes (AuNP), após a imobilização de moléculas de ab-Mb sobre o filme de AuNP-PEI/BrPy/GCE.

**Figura 26.** Imagens de FEG-SEM para: (A) GCE não modificado, (B) Br-Py/GCE, (C) AuNP-PEI/Br-Py/GCE e (D) ab-Mb/AuNP-PEI/Br-Py/GCE, observadas a 10 kV.



**Figura 27.** Microscopia óptica polarizada (200 X) de uma solução concentrada de Br-Py em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à temperatura ambiente.



#### 4.1.4. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor

A fim de otimizar a construção do imunossensor e as condições experimentais de operação do mesmo, alguns parâmetros foram investigados utilizando a CV e a SWV. Os parâmetros investigados primeiramente foram a quantidade de Br-Py (1,0 – 4,0  $\mu\text{L}$ ) e a quantidade de AuNP-PEI (1,0 – 4,0  $\mu\text{L}$ ) utilizados para a formação do filme sobre a superfície do GCE. Após a otimização da construção da plataforma do imunossensor, o efeito da variação do pH (6,0 – 8,0) da solução de PBS (0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), empregada como eletrólito de suporte, foi investigado por CV e SWV. Posteriormente, os parâmetros de SWV (frequência, amplitude e incremento de potencial) foram otimizados para obter o melhor desempenho do imunossensor. O tempo de incubação utilizado nos imunoenaios também foi otimizado na faixa de 1 a 60 min.

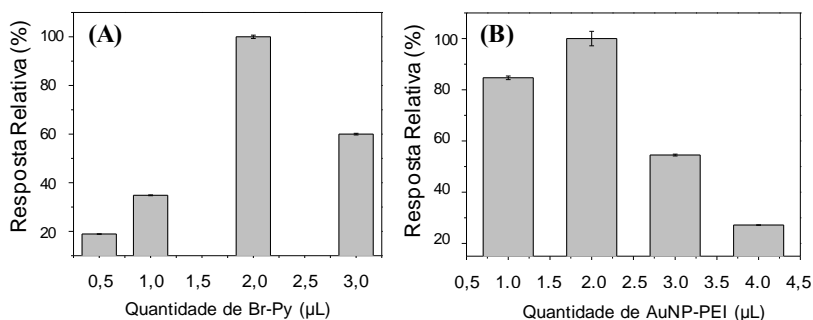
A otimização da quantidade de Br-Py (Figura 28-A) foi realizada variando-se o volume depositado sobre o eletrodo, tendo em vista a pequena área geométrica do eletrodo (diâmetro do eletrodo 2 mm). O aumento do volume (0,5 a 3,0  $\mu\text{L}$ ), e conseqüentemente a espessura do filme, resultou numa reação de transferência de carga mais lenta (menor intensidade de corrente de pico), efeito que pode ser atribuído ao fato das moléculas internas responderem de forma mais

lenta do que as externas, pois a transferência de elétrons e a difusão dos íons hidrogênio provavelmente estão mais impedidas no filme mais espesso (XIA *et al.*, 1996). Portanto optou-se em selecionar 2  $\mu\text{L}$  como melhor quantidade de Br-Py para os demais estudos.

A adição de AuNP torna o filme mais condutor, proporcionando um aumento na corrente de resposta do sensor quando um volume de 2,0  $\mu\text{L}$  da suspensão de AuNP-PEI foi empregado (Figura 28-B). No entanto, uma quantidade superior de AuNP-PEI leva a um aumento da espessura do filme que reduz a taxa de transferência eletrônica. Portanto o volume de 2  $\mu\text{L}$  de AuNP-PEI foi selecionado para os demais estudos.

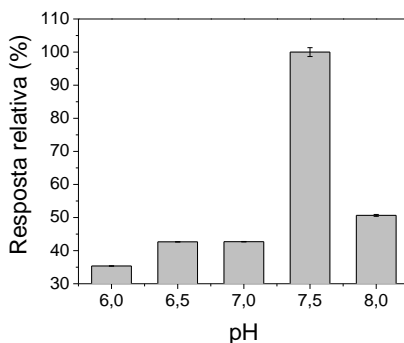
O estudo de pH foi conduzido na faixa de valores de 6,0 – 8,0, sendo o sinal da sonda redox Br-Py usado para avaliar o efeito deste parâmetro. As respostas aos diferentes valores de pH estão representados na Figura 29, e o critério utilizado para seleção do valor de pH foi a maior corrente de pico obtida. Coincidentemente, o melhor valor de pH foi 7,5, o que é próximo do pH fisiológico, o que confere um ponto positivo para o uso desse sensor para detecção de analitos em amostras biológicas.

**Figura 28.** Otimização da quantidade de (A) Br-Py (Faixa estudada: 0,5 a 3  $\mu\text{L}$ ) e (B) AuNP-PEI (Faixa estudada: 1 a 4  $\mu\text{L}$ ) usando SWV em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5).



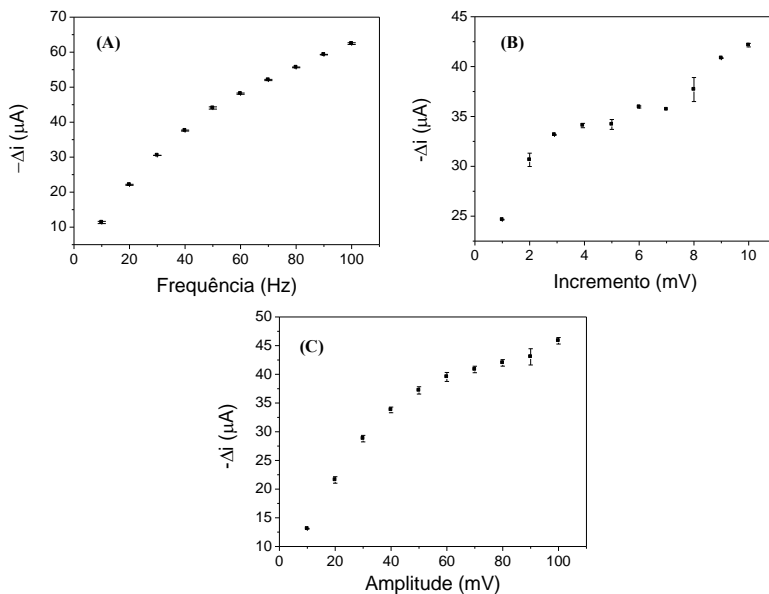


**Figura 29.** Efeito da variação do pH (6–8) da solução de PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>) sobre a resposta do imunossensor empregando a SWV.



A SWV foi selecionada como técnica voltamétrica por se tratar de uma técnica rápida e sensível, que vai ao encontro da proposta de construção de um imunossensor do ponto de vista de aplicabilidade em ensaios clínicos. Portanto, a fim de se obter as melhores condições de trabalho otimizou-se os parâmetros de SWV através de uma análise univariada considerando as melhores respostas de corrente em função do parâmetro avaliado (Figura 30). O efeito dos parâmetros da SWV – frequência (10-100 Hz), amplitude (1-10 mV) e incremento (1-10 mV) – foram investigados empregando o sensor proposto em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5). Para todas as medidas, foram avaliadas as melhores respostas obtidas, em termos de maior corrente resultante, melhor perfil dos picos, e menor ruído nos voltamogramas. O melhor perfil voltamétrico foi obtido em 60 Hz de frequência, 50 mV de amplitude e 4 mV de incremento, sendo estes valores selecionados para dar continuidade ao trabalho.

**Figura 30.** Efeito dos parâmetros de SWV na resposta analítica do eletrodo modificado: (A) frequência (faixa de estudo: 10 –100 Hz) com incremento de 5 mV e amplitude de 50 mV; (B) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 50 Hz e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 60 Hz e incremento de 4 mV.

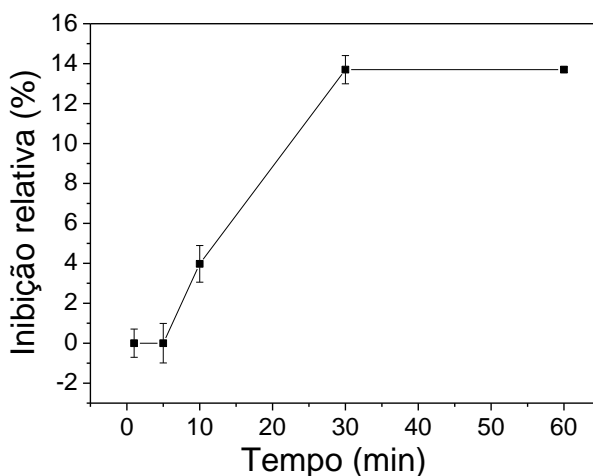


A velocidade em SWV é obtida pelo produto da frequência e do incremento, sendo que o aumento dos valores de corrente obtidos em relação ao aumento dos valores desses dois parâmetros já era um resultado esperado. A partir da equação de Parry e Osteryoung sabe-se que  $i_p$  é proporcional à concentração da espécie eletroativa e também à amplitude do pulso. Aumentando-se a amplitude do pulso aumenta-se o valor da corrente, sendo então maior a sensibilidade. Entretanto, um aumento da amplitude (acima de 50 mV) provoca um aumento na largura do pico, reduzindo a resolução.

O tempo de incubação é um parâmetro importante para avaliar o tempo de análise e, portanto, o tempo necessário para o diagnóstico utilizando o imunossensor. Uma faixa de 1 a 60 min foi avaliada como tempo de incubação necessário para gerar uma supressão significativa do sinal de corrente para uma incubação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de Mb (Figura 31). No início da faixa (1 a 5 min) não foi observado supressão do sinal

medido pelo imunossensor, e, portanto admitiu-se ser um tempo insuficiente para a formação efetiva de imunocomplexos sobre a superfície do eletrodo. Com o tempo de 10 min uma inibição de aproximadamente 4% foi observada, porém essa faixa de tempo até o valor de 30 min apresenta grande nível de variação do sinal, se estabilizando em tempos maiores. Portanto, 10 min é um tempo adequado para um diagnóstico rápido, porém com pouca precisão, enquanto que a partir de 30 min observa-se um sinal mais robusto, porém com um maior tempo necessário para o diagnóstico. Tendo em vista as discussões acima, selecionou-se um tempo de incubação de 10 min para detecção de Mb visando uma metodologia mais rápida, considerando-se 10 min o tempo suficiente para causar uma mudança no sinal do imunossensor após a incubação com a Mb.

**Figura 31.** Efeito do tempo de incubação (1 a 60 min) para imunossensor empregando  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de Mb em  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  PBS (pH 7,5).



Os parâmetros acima mencionados e os melhores resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2. Estas condições otimizadas foram usadas nos demais experimentos.

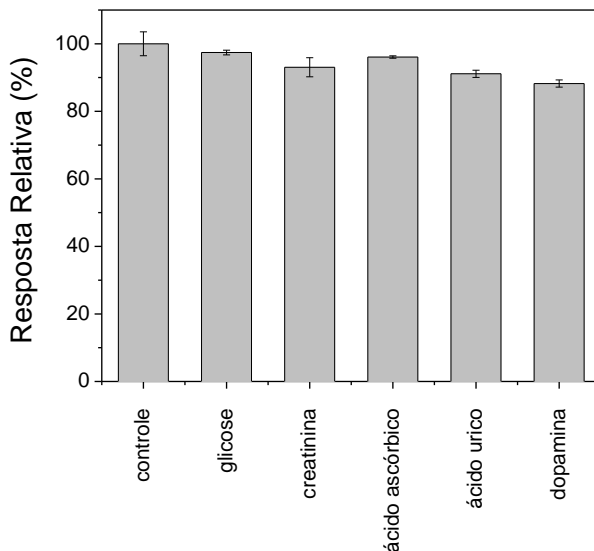
**Tabela 2.** Resumo dos parâmetros de otimização avaliados e as melhores respostas obtidas

Parâmetro	Faixa	Melhor Reposta
Quantidade de Br-Py ( $\mu\text{L}$ )	0,5 – 3,0	2,0
Quantidade de AuNP- PEI ( $\mu\text{L}$ )	1,0 – 4,0	2,0
pH	6,0 – 8,0	7,5
Frequência (Hz)	10 – 100	60
Amplitude (mV)	10 – 100	50
Incremento (mV)	1 – 10	4
Tempo de incubação (min)	1 – 60	10

#### 4.1.5. Estudo de interferentes e reprodutibilidade

A fim de avaliar possíveis efeitos de interferência sobre as medidas realizadas com o imunossensor para determinação de Mb, alguns dos principais compostos presentes em amostras biológicas (especialmente sangue) foram testados. A capacidade dos mesmos de ligarem-se à superfície do eletrodo não sendo removidos pela lavagem com PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5) foi avaliada individualmente frente a porcentagem de inibição conferida pelo interferente, em relação ao pico voltamétrico base. Os compostos avaliados foram: glicose ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatinina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido úrico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e dopamina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). As respostas obtidas nesse estudo estão apresentadas na Figura 32, sendo que um baixo nível de interferência (inferior a 10%) foi observado para todos os compostos testados, quando comparados ao teste de controle (incubação apenas em PBS).

**Figura 32.** Estudo de compostos potencialmente interferentes em relação à resposta do imunossensor, compostos testados: glicose ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatinina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido úrico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e dopamina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).



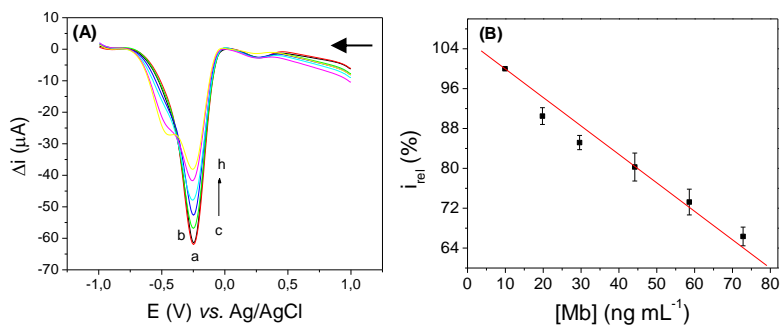
A reprodutibilidade da resposta do imunossensor para  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de Mb foi avaliada com base na determinação individual de cinco imunossensores construídos sob as mesmas condições, todas as medidas foram obtidas em solução de PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5). O desvio padrão relativo calculado para esse estudo foi 4,3%, indicando uma boa reprodutibilidade para o presente imunossensor.

#### 4.1.6. Curva de calibração para Mb

A Figura 33-A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de Mb, onde para cada aumento na concentração de Mb, há uma supressão na corrente de pico em relação à medida base (pico base). A medida do controle (incubação com PBS) mostra que a inibição é específica e está diretamente relacionada à formação do imunocomplexo. A dependência linear (Figura 33-B) entre a inibição do pico voltamétrico em função da concentração de Mb foi obtida no intervalo de  $10$  a  $72,8 \text{ ng mL}^{-1}$ . A curva apresenta a seguinte equação de regressão:  $i_{\text{rel}} = 100,6 (\pm 1,07) - 0,51 (\pm 0,02) [\text{Mb}]$ , com um

coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,995, onde  $i_{rel}$  é a corrente de inibição relativa do pico voltamétrico (%) e  $[Mb]$  é a concentração de mioglobina ( $ng\ mL^{-1}$ ). O limite de detecção calculado ( $LOD = \text{três vezes o desvio padrão do intercepto} / \text{inclinação}$ ) para esse método foi de  $6,3\ ng\ mL^{-1}$ .

**Figura 33.** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento 4 mV para: (a) pico base (PBS ( $0,01\ mol\ L^{-1}$ , pH 7,5)), (b) controle (incubação em PBS), (c)  $10\ ng\ mL^{-1}$ , (d)  $19,8\ ng\ mL^{-1}$ , (e)  $29,6\ ng\ mL^{-1}$ , (f)  $42,2\ ng\ mL^{-1}$ , (g)  $58,6\ ng\ mL^{-1}$  e (h)  $72,8\ ng\ mL^{-1}$  de Mb. (B) curva de calibração para mioglobina.



#### 4.1.7. Determinação de Mb

A resposta analítica do imunossensor foi investigada em um imunoenensaio, que consistiu na incubação dos sensores em amostras de soro simulado contendo Mb ( $10, 20$  e  $30\ ng\ mL^{-1}$ ) ou amostras de Mb em PBS ( $35, 45$  e  $55\ ng\ mL^{-1}$ ). Os resultados destas determinações encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Determinação de Mb em amostras simuladas

Amostra	$[Mb]$ esperada ( $ng\ mL^{-1}$ )	$[Mb]$ detectada ( $ng\ mL^{-1}$ )	Erro (%)
Soro	10	$10,9 \pm 0,8$	9,0
Soro	20	$20,8 \pm 1,9$	4,0
Soro	30	$29,9 \pm 0,9$	-0,3
PBS	35	$33,9 \pm 0,2$	-3,1
PBS	45	$48,3 \pm 1,6$	7,3
PBS	55	$50,0 \pm 1,3$	-9,1

O imunossensor proposto para a determinação Mb em amostras de soro simulado mostrou precisão adequada para um diagnóstico rápido do IAM. Comparando os resultados obtidos com a metodologia proposta em relação a outros métodos previamente apresentados na literatura (Tabela 4), o valor de LOD obtido para o imunossensor proposto foi comparável e em alguns casos até inferior, sendo que o tempo de análise para o presente estudo foi menor.

**Tabela 4.** Comparação de diferentes imunossensores aplicados na determinação de Mb

Composição do eletrodo <sup>a</sup>	Tipo de Detecção	Tempo de incubação (min)	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Referência
ab-Mb/MUA-MPA/Au	<i>Label free</i> – Impedimétrico	-	5,2	RAJESH <i>et al.</i> , 2010
SPE/DDAB/AuNP/ab-Mb	<i>Label free</i> – Voltamétrico	15	10	SUPRUN <i>et al.</i> , 2010
SPE/DDAB-MNP	<i>Label free</i> – Voltamétrico	20	5	SUPRUN <i>et al.</i> , 2011
MIP/Au-SPE	<i>Label free</i> – Impedimétrico	240	225	MOREIRA <i>et al.</i> , 2013
ab-Mb/AuNP/Br-Py/GCE	<i>Label free</i> – Voltamétrico	10	6,3	Este trabalho

<sup>a</sup> Au: Eletrodo de ouro; MPA: ácido 3-mercaptopropiônico; MUA: ácido 11-mercaptoundecanóico; DDAB: brometo de didodecildimetilamônio; MNP: Nanopartícula metálica; MIP: polímero molecularmente impresso; SPE: eletrodo impresso.





## **CAPÍTULO 5. IMUNOSSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE TROPONINA T**

*Publicado em: Bioconjugate Chemistry, 25 (9), 1638–1643, 2014.*

*(Fator de impacto 2014: 4.821)*

### **Resumo:**

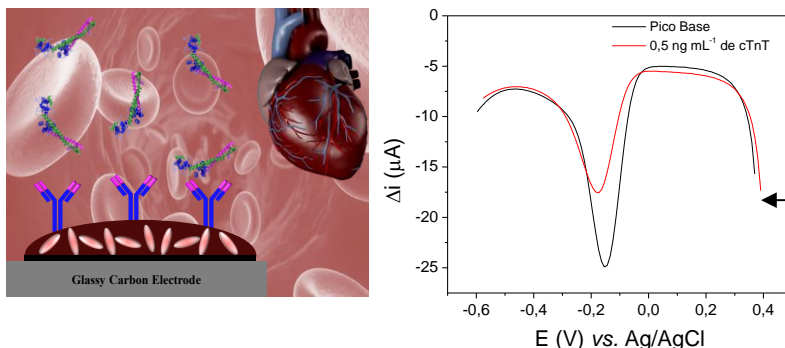
*Este capítulo apresenta os resultados e discussões referentes ao imunossensor eletroquímico não marcado para detecção de cTnT. O imunossensor baseia-se em um filme do CL Br-Py e AuNP-Sil sobre a superfície de um GCE. Sobre o filme de AuNP-Sil foram imobilizadas por adsorção física moléculas do anticorpo monoclonal ab-cTnT. O método proposto baseia-se na supressão voltamétrica do sinal da sonda Br-Py após incubação do imunossensor com o antígeno cTnT.*

## 5.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.1. Princípio de funcionamento

O princípio de sensoriamento para a detecção de cTnT usando o imunossensor baseia-se na inibição do pico voltamétrico da sonda redox Br-Py (Figura 34-A), como descrito na seção 4.1.2, a medida que moléculas de cTnT ligam-se especificamente à superfície do imunossensor (Figura 34-B), sendo essa interação monitorada por SWV. A formação do imunocomplexo é responsável pelo bloqueio parcial da superfície eletroativa, e, portanto, é possível comparar o resultado da inibição do pico voltamétrico na presença do antígeno em relação ao obtido para o ensaio do branco (pico base). Primeiramente, um voltamograma de onda quadrada foi obtido usando o imunossensor em solução de PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) para se obter o pico base (ausência de cTnT). Subsequentemente, o imunossensor foi incubado durante 10 min com  $3 \mu\text{L}$  da amostra contendo cTnT. Após cada etapa do imunoenensaio a superfície do eletrodo foi exaustivamente lavada com PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) a fim de remover possíveis moléculas que adsorvam-se fracamente e reversivelmente sobre a superfície do imunossensor, e então um segundo voltamograma foi obtido. O grau de inibição do pico voltamétrico foi correlacionada com a concentração de cTnT (Figura 34-C).

**Figura 34.** Representação esquemática da superfície do imunossensor. (B) Voltamogramas de onda quadrada na ausência ( - ) e na presença de cTnT ( - ).



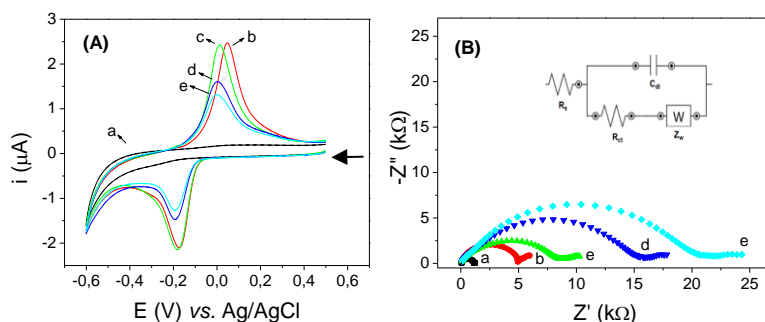
### 5.1.2. Comportamento eletroquímico

O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados foi acompanhado em cada etapa de obtenção do imunossensor através da CV e EIS (Figura 35), os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos obtidos no trabalho anterior, e os mesmos foram descritos e discutidos na seção 4.1.2. Como esperado, para o GCE não modificado (voltamograma “a”), quando o potencial foi variado no intervalo de 0,6 a -0,6 V nenhum pico voltamétrico foi observado. Após o recobrimento da superfície do GCE pelo filme de Br-Py (voltamograma “b”), é possível observar o aparecimento de um par de picos voltamétricos, atribuídos à presença da molécula Br-Py. Na etapa seguinte, quando o filme de AuNP-Sil foi depositado na superfície do sensor Br-Py/GCE (voltamograma “c”), uma pequena redução na separação dos picos foi observada, demonstrando um processo termodinamicamente mais favorável para transferência de carga da molécula de Br-Py (SILVA *et al.*, 2014A). Também pode ser observado na Figura 35-A que a imobilização de moléculas de ab-cTnT (voltamograma “d”) e bloqueio com glicina (voltamograma “e”) causam uma supressão dos picos voltamétricos quando comparados com sensor c, de 36% e 48%, respectivamente. Estes resultados indicam um decréscimo no processo faradaico atribuído às alterações que ocorrem na superfície do sensor devido ao isolamento proporcionado pelas moléculas de proteína e aminoácidos (MENDES *et al.*, 2009). Portanto, as respostas voltamétricas indicam claramente uma alteração na dinâmica da transferência de carga na superfície do sensor.

A EIS também foi utilizada para avaliar a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) para cada etapa de construção do imunossensor. A Figura 35-B mostra os diagramas de Nyquist ( $-Z''$  vs.  $Z'$ ) obtidos para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-Sil/Br-Py/GCE, (d) ab-cTnT/AuNP-Sil e (e) gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE em solução de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$   $5 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1} Fe(CN)_6^{3-/4-}$ . Os espectros obtidos foram ajustados ao modelo de circuito de Randles já descrito anteriormente. Os valores  $R_{ct}$  obtidos foram: GCE não modificado (1,2 k $\Omega$ ), Br-Py/GCE (5,0 k $\Omega$ ), AuNP-Sil/Br-Py/GCE (8,5 k $\Omega$ ), ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE (15,5 k $\Omega$ ) e gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE (20,5 k $\Omega$ ). Como já descrito no item 4.1.2 e também observado na Figura 35-B, a cada etapa de modificação houve um aumento significativo na  $R_{ct}$  dos eletrodos, provando que a superfície do eletrodo foi modificada. O maior aumento na  $R_{ct}$  ocorreu na presença de moléculas da proteína (espectro “d”), o que é consistente com o princípio de funcionamento

observado através da voltametria, onde a supressão do sinal pode ser atribuída à natureza isolante de ab-cTnT (Figura 35-A – voltamograma “d”).

**Figura 35.** Comportamento eletroquímico: (A) Voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-Sil/Br-Py/GCE, (d) ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE e (e) gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE. (B) Diagrama de Nyquist obtidos em KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em modo de circuito aberto,  $10 \text{ mV}$  de amplitude e faixa de frequência de  $0,1\text{--}100.000 \text{ Hz}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo para: (a) GCE não modificado, (b) Br-Py/GCE, (c) AuNP-Sil/Br-Py/GCE, (d) ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE e (e) gly/ab-cTnT/AuNP-Sil/Br-Py/GCE.

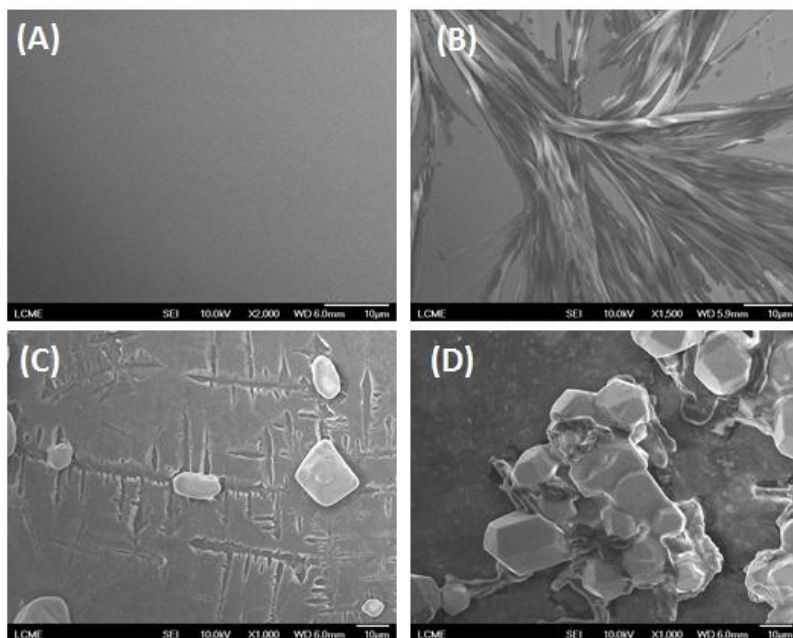


### 5.1.3 Caracterização morfológica da superfície do imunossensor

Análises de SEM-FEG foram realizadas com o intuito de examinar a morfologia da superfície do imunossensor. A Figura 36 apresenta as micrografias de SEM-FEG obtidas nas diferentes etapas de construção do imunossensor. Na Figura 36-A podemos visualizar claramente a superfície homogênea de um GCE limpo e não modificado, enquanto que a Figura 36-B apresenta uma estrutura do tipo fibrosa referente ao recobrimento do GCE pelo filme sólido de moléculas de Br-Py, relacionado a uma retenção da estrutura a partir de um estado liotrópico durante a secagem do filme, conforme discutido na seção 4.1.4 (ZAPP *et al.* 2014A). Na Figura 36-C, após a imobilização das moléculas de ab-cTnT, podemos observar que a superfície fibrosa devido o filme de Br-Pr é recoberto por uma camada referente à AuNP-Sil acompanhado pela formação de pequenos aglomerados com forma retangular devido a interação de AuNP-Sil com as moléculas de ab-

cTnT. Finalmente, na Figura 36-D pode-se observar evidentemente que uma mudança na textura do filme ocorreu, indicando a presença de moléculas de glicina (gli), que foram empregadas com a finalidade de bloquear os sítios livres da superfície do eletrodo, principalmente devido ao filme de AuNP-Sil, e inibem a adsorção não específica de outras moléculas.

**Figura 36.** Imagens de FEG-SEM de: (A) GCE não modificado, (B) Br-Py/GCE, (C) ab-cTnT/AuNP/Br-Py/GCE, e (D) gli/ab-cTnT/AuNP-Si4Pic<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>/Br-Py/GCE, obtidas utilizando 10 kV.

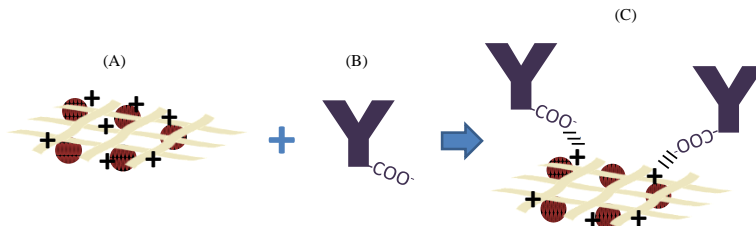


#### 5.1.4. Imobilização dos anticorpos

Supõe-se que a formação de conjugados entre as moléculas de ab-cTnT e AuNP-Sil ocorre devido à interação eletrostática entre as NP metálicas carregadas positivamente, devido à presença do grupo 4-picolínio do silsesquioxano usado como estabilizante, e a carga negativa da ab-cTnT (dissolvido em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5). A diminuição dos valores de potencial zeta das AuNP de +55 mV (AuNP-Sil) para

+28 mV após imobilização dos anticorpos (AuNP-Sil/ab-cTnT) corrobora com essa hipótese (Figura 37).

**Figura 37.** Proposta de para reação de imobilização usando AuNP-Sil (A) como suporte para imobilização do anticorpo ab-cTnT (B) por interação eletrostática (C).



### 5.1.5. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor

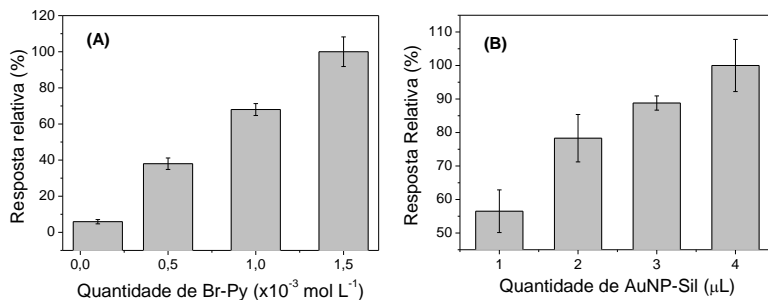
A fim de otimizar o processo de construção do imunossensor e operação do mesmo, alguns parâmetros foram investigados utilizando a SWV. Os parâmetros investigados foram a quantidade de Br-Py ( $1,0 \times 10^{-4}$  –  $1,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), sendo adicionado ao eletrodo 3 µL, e a quantidade de AuNP-Sil (1,0 – 4,0 µL) utilizadas para a formação do filme sobre a superfície do GCE. Após a otimização da construção da plataforma do imunossensor, os efeitos da variação do pH (3,0 – 9,0) da solução de PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>), empregada como eletrólito de suporte, foram investigados por CV e SWV. Posteriormente, os parâmetros de SWV (frequência, amplitude e incremento de potencial) foram otimizados para obter o melhor desempenho do imunossensor.

A molécula de Br-Py atua como uma sonda redox, e a resposta de corrente de pico aumenta com o aumento da quantidade de Br-Py, como pode ser observado na Figura 38-A. Contudo, optou-se em selecionar  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, embora  $1,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> tenha apresentado maior resposta, pois esta última concentração apresentou baixa reprodutibilidade, provavelmente devido ao aumento da espessura e irregularidade do filme.

A presença de AuNP-Sil melhora o processo de transferência de carga, resultando no aumento das correntes de pico obtidas com o imunossensor (Figura 38-B), principalmente pelo aumento da área superficial. O filme de AuNP-Sil atua também como suporte para imobilização dos anticorpos ab-cTnT. A adição de AuNP-Sil torna o

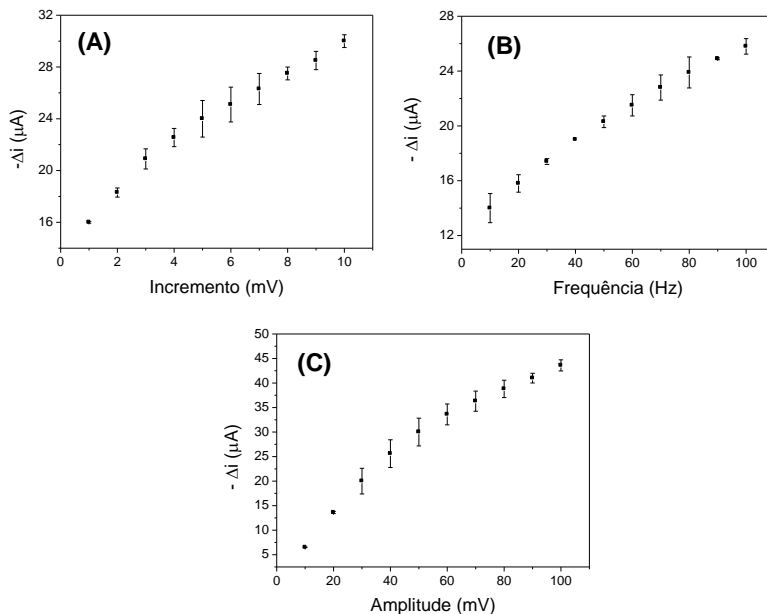
filme mais condutor, proporcionando um expressivo ganho de resposta do sensor, porém volumes acima de 2,0  $\mu\text{L}$  torna difícil a montagem do filme devido a pequena área do GCE.

**Figura 38.** Otimização da quantidade de (A) Br-Py (Faixa estudada:  $0,1 \times 10^{-3}$  a  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (B) AuNP-Sil (Faixa estudada: 1 a 4  $\mu\text{L}$ ) usando SWV em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5).



Selecionou-se a SWV como técnica voltamétrica para a detecção dos eventos de imunoensaio, devido a sua rapidez e sensibilidade, como já discutido anteriormente. Os parâmetros de SWV foram avaliados através de uma análise univariada e considerando as melhores respostas de corrente em função do parâmetro avaliado (Figura 39). O efeito dos parâmetros da SWV – frequência (10-100 Hz), amplitude (1-10 mV) e incremento (1-10 mV) – foram investigados empregando o imunossensor proposto em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5). Para todas as medidas foram avaliadas simultaneamente as melhores respostas obtidas (corrente resultante), melhor perfil dos picos, e menor ruído nos voltamogramas. O melhor perfil voltamétrico foi obtido em 100 Hz de frequência, 80 mV de amplitude e 10 mV de incremento, sendo estes valores selecionados para dar continuidade ao trabalho.

**Figura 39.** Efeito dos parâmetros de SWV na resposta analítica do eletrodo modificado: (A) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 50 Hz e amplitude de 50 mV; (B) frequência (faixa de estudo: 10 –100 Hz) com incremento de 10 mV e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 100 Hz e incremento de 10 mV.

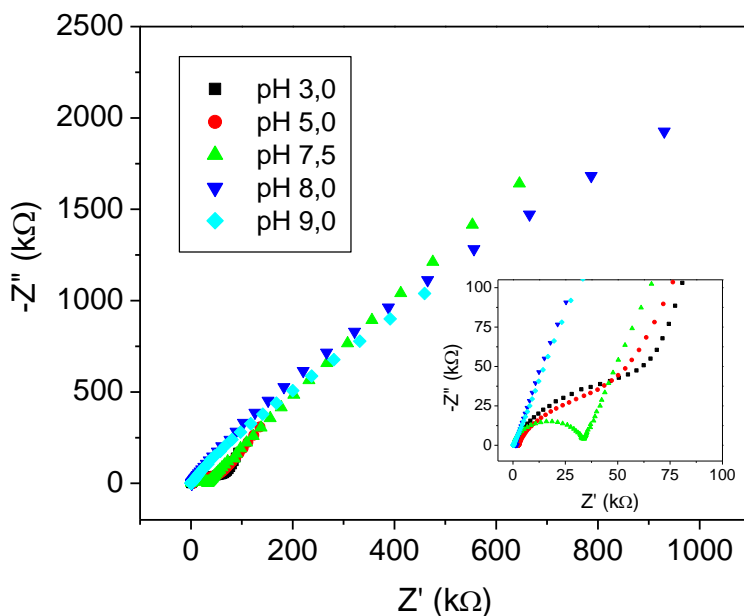


Após a otimização da construção da plataforma do imunossensor e dos parâmetros da SWV, o efeito da variação de pH do eletrólito de suporte (3,0 – 9,0) sobre a resposta eletroquímica do imunossensor foi investigado por EIS (Figura 40). O pH da solução do eletrólito suporte também pode afetar a imobilização dos anticorpos por adsorção física (ZHAO *et al.*, 2012). Esta dependência pode estar relacionada com as diferenças na carga e no grau de hidrofobicidade das regiões variáveis dos anticorpos que podem determinar a sua orientação e o seu estado conformacional, que são condições dependentes para a sua adsorção (TARAKANOVA *et al.*, 2012). A Figura 40 mostra os diagramas de Nyquist para diferentes valores de pH. Como pode ser claramente observado, o pH tem um efeito significativo sobre a dinâmica de adsorção e também sobre a quantidade de moléculas adsorvida. A maior adsorção ocorreu em um valor de pH de 7,5 (valor



empregado para aplicações clínicas), esse valor de pH foi escolhido com base no diagrama que apresentou um perfil bem definido com um aumento da  $R_{ct}$ , mostrando que este valor de pH foi favorável para a imobilização dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo modificado com AuNP-Sil. Na faixa de pH de 3,0 –5,0 também foi observada uma boa adsorção das moléculas do anticorpo, mas este intervalo de pH não é adequado para análise biológicas diretas. Em valores de pH mais alcalinos a adsorção do anticorpo não foi observada.

**Figura 40.** Influência do pH de 3,0 a 9,0 na imobilização de ab-cTnT sobre o filme de AuNP-Sil medida por EIS obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz.



Os parâmetros anteriormente mencionados e os melhores resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5. Estas condições otimizadas foram usadas nos demais experimentos.

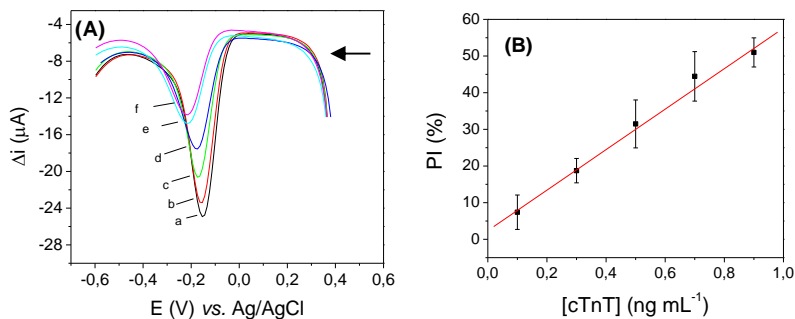
**Tabela 5.** Resumo dos parâmetros de otimização avaliados e as melhores respostas obtidas

Parâmetro	Faixa	Melhor Reposta
Quantidade de Br-Py (mol L <sup>-1</sup> )	1,0x10 <sup>-4</sup> – 1,5x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>
Quantidade de AuNP (µL)	1,0 – 4,0	3,0
Frequência (Hz)	10 – 100	100
Amplitude (mV)	10 – 100	80
Incremento (mV)	1 – 10	10
pH	3,0 – 9,0	7,5

### 5.1.6. Curva de calibração para cTnT

A Figura 41 mostra a curva de calibração obtida com concentrações crescentes de cTnT entre 0,1 e 0,9 ng mL<sup>-1</sup>, utilizando a SWV em uma faixa de potencial de 0,6 a -0,6 V. A equação de regressão linear obtida foi  $PI = 2,4 (\pm 1,4) + 55,2 (\pm 2,4) [cTnT]$ , com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,997, onde PI é a porcentagem de inibição do pico voltamétrico (%) e [cTnT] é a concentração de troponina T cardíaca (ng mL<sup>-1</sup>). O limite de detecção calculado (LOD = três vezes o desvio padrão do intercepto / inclinação) foi de 0,08 ng mL<sup>-1</sup>. De acordo com a OMS, os indivíduos saudáveis têm níveis sanguíneos de cTnT inferior a 0,01 ng mL<sup>-1</sup>. Além disso, 0,3 ng mL<sup>-1</sup> de cTnT foi estabelecida como critério para o diagnóstico de IAM com base neste biomarcador. Em cerca de três a quatro horas após o início da lesão miocárdica o nível sanguíneo de cTnT ultrapassa 0,3 ng mL<sup>-1</sup>. Assim, a faixa de concentração linear obtida para cTnT (0,1 ng mL<sup>-1</sup> a 0,9 ng mL<sup>-1</sup>) utilizada neste estudo é suficiente para diferenciar entre pessoas saudáveis e um possível acometimento por IAM.

**Figura 41.** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com frequência de 100 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 4 mV usando o imunossensor proposto para: (a) pico base (PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), (b) 0,1 ng mL<sup>-1</sup>, (c) 0,3 ng mL<sup>-1</sup>, (d) 0,5 ng mL<sup>-1</sup>, (e) 0,7 ng mL<sup>-1</sup> e (f) 0,9 ng mL<sup>-1</sup> de cTnT. (B) Curva de calibração para cTnT.



### 5.1.7. Reprodutibilidade e estabilidade

A reprodutibilidade do imunossensor proposto foi avaliada através da detecção de 0,5 ng mL<sup>-1</sup> de cTnT, sendo o desvio padrão relativo para seis medidas individuais igual a 8,0%. A estabilidade do imunossensor foi avaliada ao longo de um período de aproximadamente 15 dias, para este estudo o imunossensor foi armazenado a 4 °C. Após o período de armazenagem o mesmo nível de inibição voltamétrica foi obtido para a incubação do imunossensor com cTnT, a variação de sinal obtido foi de 2,9%, para período de avaliação.

### 5.1.8. Estudo de possíveis composto interferentes

Para investigar possíveis interferências, um estudo foi realizado com seis compostos potencialmente interferentes (creatina, creatinina, ácido úrico, glicose, ácido ascórbico e BSA), presentes em amostras de soro sanguíneo. Os resultados da Tabela 6 mostram um baixo nível de interferência para a maioria das espécies testadas em relação ao ensaio de controle, com uma porcentagem de variação inferior a 10%. Apenas a creatina causou uma diminuição notável na corrente de pico, ligeiramente maior do que 10%. O soro simulado (ver composição no item 3.1.1) também foi avaliado em termos de interferência gerada, sendo obtido um valor de 7% de desvio do valor base.

**Tabela 6.** Estudo de compostos potencialmente interferentes

<b>Composto</b>	<b>Porcentagem de interferência (%)</b>
Creatina (10,7 mg L <sup>-1</sup> )	12,6
Creatinina (4,2 mg L <sup>-1</sup> )	6,4
Ácido úrico (10 mg L <sup>-1</sup> )	8,2
Glicose (200 mg L <sup>-1</sup> )	8,2
Ácido ascórbico (10 mg L <sup>-1</sup> )	1,9
BSA (40 mg L <sup>-1</sup> )	1,3

### 5.1.9. Aplicação do imunossensor na determinação de cTnT

A resposta analítica para o imunossensor proposto foi obtida pela incubação do sensor em amostras de soro sintético ou amostras de plasma sanguíneo ambos contendo 0,3 ng mL<sup>-1</sup> de cTnT. Os resultados para as amostras analisadas estão apresentados na Tabela 7, os quais apresentaram um erro relativo de inferior a 15% em relação ao valor esperado.

**Tabela 7.** Determinação de cTnT em soro sintético e plasma sanguíneo (contendo 0,3 ng mL<sup>-1</sup> de cTnT)

<b>Amostra</b>	<b>[cTnT] detectada (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro (%)</b>
Soro simulado	0,26±0,17	-13,3
Soro simulado	0,26±0,01	-13,3
Soro simulado	0,32±0,26	6,7
Plasma sanguíneo	0,28±0,01	-6,7

A Tabela 8 resume os resultados previamente publicados na literatura obtidos com imunossensores para troponina cardíaca com base em vários métodos e materiais. Pode ser observado que o imunossensor proposto tem uma faixa linear de trabalho relativamente ampla e um baixo LOD para a determinação de cTnT com respeito a dados previamente relatados. Além disso, o tempo associado com a análise

empregando o imunossensor proposto é curto, o que faz com que seja uma metodologia extremamente atraente, especialmente para uso como um dispositivo do tipo *point-of-care*.

**Tabela 8.** Comparação de diferentes imunossensores para troponina baseado em vários métodos e materiais

Método	Material	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Tempo de incubação (min)	Referência
CV e EIS	CNF	0,1 – 100	0,2	60	(PERIYAKA RUPPAN <i>et al.</i> , 2013)
ELC	Luminol-AuNP	0,1 – 1000	0,06	40	(LI <i>et al.</i> , 2013)
CV	o-PD/Au	0,009 – 0,8	0,009	10	(KARIMIAN <i>et al.</i> , 2013)
SAW	AuNP	0,01– 25	0,0067	20	(LEE <i>et al.</i> , 2013)
ASV	Material Mesoporoso	0,8 – 5,0	0,5	30	(GUO <i>et al.</i> , 2007)
FET	Nanofios de Silício	0,096 – 46	0,092	-	(KONG <i>et al.</i> , 2012)
SWV	LC/AuNP/GCE	0,1 – 0,9	0,08	10	Este trabalho

CV: voltametria cíclica; EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica; CNF: nanofibras de carbono; ELC: eletroquimioluminescência; AuNP: nanopartículas de ouro; o-PD: o-fenilenodiamina; Au: eletrodo de ouro; SAW: onda acústica de superfície; ASV: voltametria de redissolução anódica; FET: transistores de efeito de campo ; SWV: voltametria de onda quadrada; LC: cristal líquido; GCE: eletrodo de carbono vítreo.



## **CAPÍTULO 6. IMUNOSSENSOR À BASE DE CRISTAL LÍQUIDO COLUNAR E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE TROPONINA I EM PLASMA**

*Manuscrito em construção*

### **Resumo:**

*Este capítulo apresenta os resultados e discussões referentes ao imunossensor eletroquímico não marcado para detecção de cTnI. O imunossensor baseia-se em um filme de CL colunar e AuNP-PAH sobre a superfície de um GCE. Sobre o filme de AuNP-PAH foram imobilizadas covalentemente moléculas do anticorpo monoclonal ab-cTnI usando EDC/NHS como reagente de ligação cruzada. O método proposto baseia-se na supressão voltamétrica do sinal da sonda  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  ou aumento do sinal impedimétrico após incubação do imunossensor com o antígeno cTnI.*

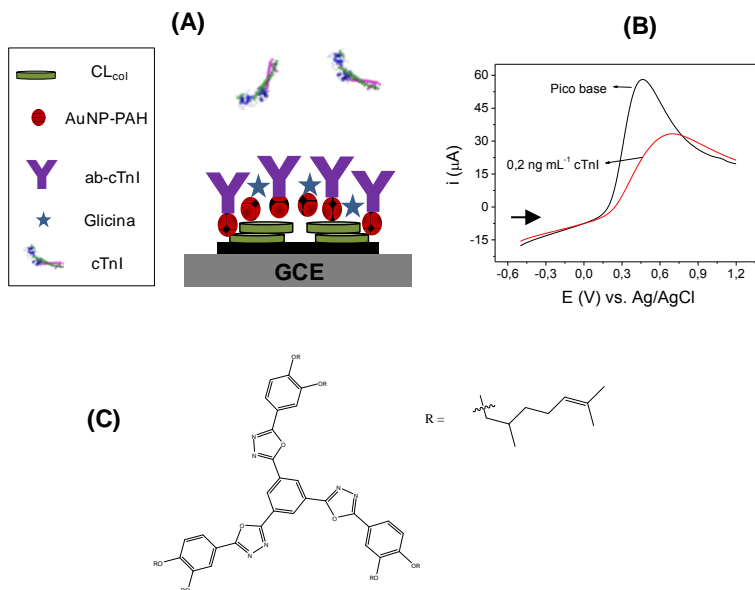
## 6.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1.1. Princípio de funcionamento

O princípio de sensoriamento para a detecção de cTnI usando o imunossensor proposto (Figura 42) baseia-se na inibição do pico voltamétrico proveniente da sonda redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  presente na solução de análise, quando se ligam as moléculas de cTnI sobre a superfície do imunossensor a base de de  $\text{CL}_{\text{col}}$  (Figura 42-C) formando um imunocomplexo específico com os anticorpos covalentemente imobilizados sobre o filme nanoestruturado (Figura 42-A). Esta formação do imunocomplexo é responsável pelo bloqueio parcial da superfície eletroativa causando um maior isolamento elétrico da camada sobre o eletrodo devido às propriedades pouco condutoras das moléculas de proteína (Figura 42-B) (MENDES *et al.*, 2009). A formação desses imunocomplexos foi monitorada simultaneamente por voltametria linear (LSV), CV e EIS. Primeiramente, um voltamograma linear é obtido usando o imunossensor em solução de PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  para se obter o pico voltamétrico base (na ausência de cTnI). Subsequentemente, o imunossensor foi incubado durante 10 min com  $3 \mu\text{L}$  da amostra contendo cTnI. Após cada etapa do imunoensaio a superfície do imunossensor foi exaustivamente lavada com PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) a fim de remover possíveis moléculas que tenham se adsorvido fracamente e reversivelmente, e então um segundo pico voltamétrico foi obtido. A porcentagem de inibição do pico foi correlacionada com a concentração de cTnI na amostra analisada. O mesmo experimento foi simultaneamente realizado com a EIS, onde inicialmente foi obtido um espectro base e após as incubações com as amostras contendo cTnI um segundo espectro foi obtido, sendo a variação na  $R_{\text{ct}}$  correlacionada com a quantidade de cTnI na amostra.



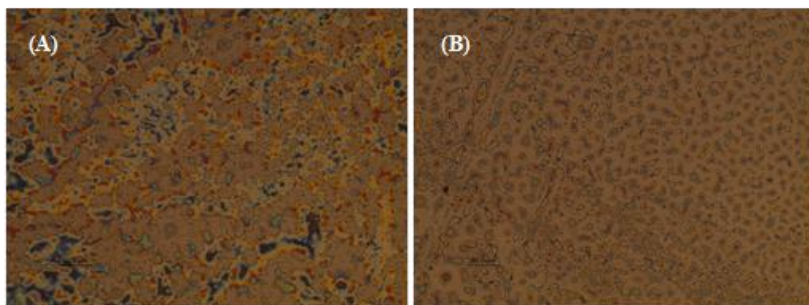
**Figura 42.** (A) Representação esquemática da superfície do imunossensor. (B) Picos voltamétricos na ausência e presença de cTnI; (C) Estrutura química do cristal líquido colunar.



### 6.1.2. Caracterização morfológica da superfície do imunossensor

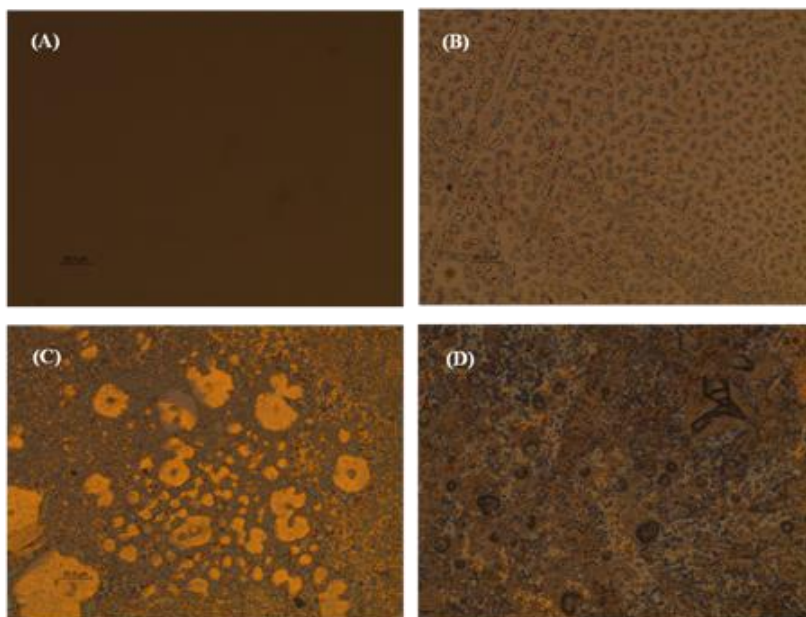
As análises de POM foram realizadas primeiramente com o intuito de examinar a morfologia da superfície do GCE com o filme de CL. A Figura 43 apresenta as micrografias de POM obtidos para: (A)  $CL_{col}/GCE$  sem aquecimento e (B)  $CL_{col}/GCE$  após aquecimento. Nesta figura é possível visualizar claramente uma alteração estrutural devido ao efeito de aquecimento ao qual o sensor foi submetido. Tendo em vista que o CL usado apresenta uma temperatura de transição para mesofase colunar próximo a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (GIRROTO *et al.*, 2014) e as superfícies dos sensores foram tratadas com temperatura igual a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , acredita-se que a imagem B seja uma evidência da organização do  $CL_{col}$  sobre a superfície do GCE, sendo essa mesma estrutura retida quando a temperatura é reduzida à temperatura ambiente.

**Figura 43.** Imagens de POM de: (A) CL<sub>col</sub>/GCE sem aquecimento e (B) CL<sub>col</sub>/GCE após aquecimento a 40°C.



Também foram realizadas análises de POM com o intuito de examinar a morfologia da superfície do imunossensor proposto. A Figura 44 apresenta as micrografias de POM obtidos nas diferentes etapas de construção do imunossensor. Na Figura 44-A podemos visualizar claramente a superfície homogênea de um GCE limpo e não modificado, enquanto que a Figura 44-B apresenta uma estrutura pontual referente ao recobrimento pelo filme de moléculas de CL na forma organizada após o aquecimento sobre o GCE, relacionado a uma retenção da estrutura a partir da mesofase termotrópica, como discutido anteriormente. Na Figura 44-C, após a formação do filme de AuNP-PAH, é possível observar a formação de pequenos aglomerados de tamanho micrométrico para o filme na forma sólida. Finalmente, na Figura 44-D uma mudança na textura do filme é observada, indicando a presença de moléculas de ab-cTnI imobilizadas sobre o filme de AuNP-PAH.

**Figura 44.** Imagens de POM para: (A) GCE, (B)  $CL_{col}/GCE$  após aquecimento a  $40^{\circ}C$ , (C)  $AuNP/CL_{col}/GCE$  e (D)  $ab-cTnI/AuNP/CL_{col}/GCE$ .



### 6.1.3. Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados

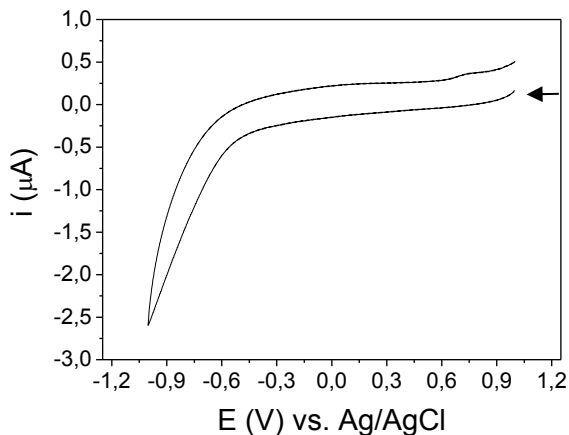
Empregou-se simultaneamente a CV e a EIS para caracterizar a superfície do GCE modificado com  $CL_{col}$ ,  $AuNP-PAH$  e  $ab-cTnI$  ativado com EDC/NHS. Tais etapas de modificação foram acompanhadas usando uma solução de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$   $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  preparada em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5).

#### 6.1.3.1. Avaliação do filme de $CL_{col}$ por CV

A plataforma empregada para o desenvolvimento do imunossensor foi caracterizada empregando CV. A Figura 45 apresenta o voltamograma do  $CL_{col}/GCE$  em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5), na janela de potencial avaliada para eletrólitos aquosos, com exceção de um processo catódico em potenciais mais negativos possivelmente devido ao oxigênio presente no eletrólito, nenhum outro pico significativo para ser usado como sonda foi observado. Portanto, optou-se em operar com

uma sonda redox em solução, sendo as medidas realizadas subsequentemente através de voltametria e EIS.

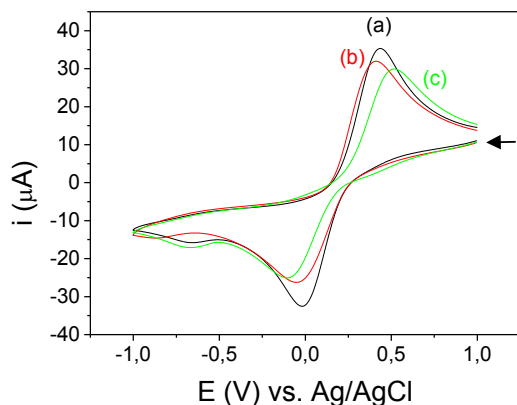
**Figura 45.** Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para o filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$ /GCE em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5).



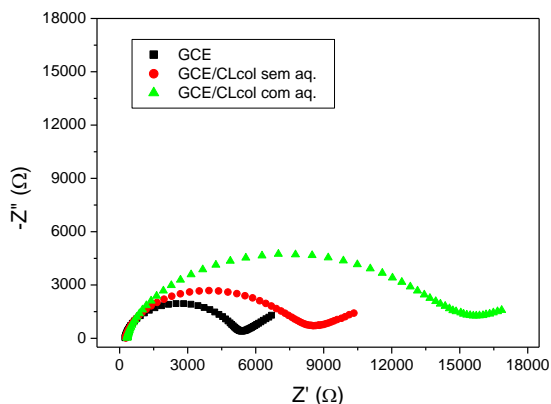
Primeiramente avaliou-se o efeito do tratamento térmico a  $40^\circ\text{C}$  em estufa para o eletrodo  $\text{CL}_{\text{col}}$ /GCE, com o intuito de promover uma organização da mesofase colunar do  $\text{CL}_{\text{col}}$ . Como é possível observar na Figura 46, o filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$  formado sobre o GCE (sem aquecimento) causa uma leve supressão do sinal voltamétrico da sonda redox, cerca de 9%, quando comparado ao GCE não modificado. Após o processo de tratamento térmico do  $\text{CL}_{\text{col}}$ /GCE, foi possível observar novamente uma leve redução da corrente de pico, queda de 15% em relação ao GCE, uma evidência de um processo cineticamente mais lento. Essa modificação também é acompanhada por um aumento nos potenciais de pico, uma evidência que o processo está se tornando termodinamicamente mais desfavorável. Esse comportamento se deve possivelmente ao empilhamento das moléculas de  $\text{CL}_{\text{col}}$  em colunas gerando um *gap* de energia (LAGERWALL e SCALIA, 2012). O mesmo pode ser avaliado pela EIS (Figura 47), levando em consideração o aumento da  $R_{\text{ct}}$ , quando o mesmo tratamento é realizado. Embora esteja havendo um ligeiro bloqueio da superfície do eletrodo pelo filme, o mesmo apresenta um papel importante na etapa seguinte de montagem do imunossensor onde um segundo filme de AuNP-PAH interage com essas moléculas de  $\text{CL}_{\text{col}}$  através de interações

intermoleculares, e então esse filme pode ser usado para imobilização dos anticorpos ab-cTnI, a combinação de CL<sub>col</sub> e AuNP-PAH mostrou-se mais estável para construção do imunossensor do que os materiais empregados individualmente com as moléculas de ab-cTnI.

**Figura 46.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para: (a) GCE não modificado, (b) CL<sub>col</sub>/GCE sem aquecimento e (c) CL<sub>col</sub>/GCE com aquecimento em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



**Figura 47.** Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: (a) GCE não modificado, (b) CL<sub>col</sub>/GCE sem aquecimento e (c) CL<sub>col</sub>/GCE com aquecimento em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



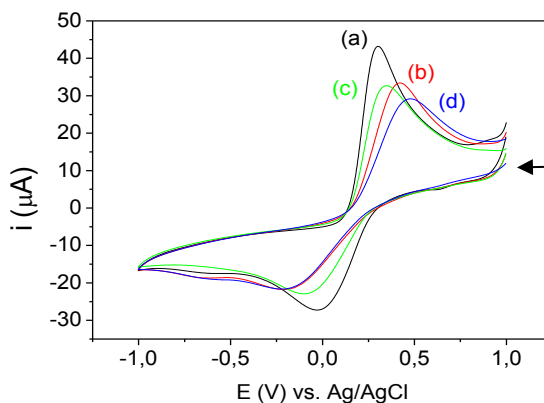
Medidas de CV de espécies eletroativas como  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  são uma valiosa e conveniente ferramenta para monitorar o efeito de bloqueio da superfície do eletrodo modificado, uma vez que a transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie em solução pode ocorrer por tunelamento através do filme modificador formado ou através dos defeitos apresentados pelo filme modificador. A transferência por tunelamento de elétron deverá ocorrer quando a superfície está completamente recoberta pelo modificador, e a segunda quando existem defeitos (regiões não modificadas) no filme do modificador. Tendo em mente um efeito de barreira, pois se espera que o filme depositado recubra a maior área possível, o grau de recobrimento da superfície do eletrodo pode ser estimado a partir da CV, resultando em uma análise semi-quantitativa do presente efeito. Assim, em geral, pequenas distorções na CV quando a mesma é comparada ao eletrodo não modificado são esperados quando o filme modificador produz um baixo recobrimento da superfície, o que significa que o acesso de espécies eletroativas da solução para o eletrodo ocorre sem significativo impedimento. Uma grande distorção do voltamograma sugere um forte efeito de barreira, o que limitaria o acesso de espécies eletroativas da solução à superfície do eletrodo. Portanto, o recobrimento da superfície do GCE pelo filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$  pode ser estimado a partir de voltamogramas cíclicos pela equação (1) (FERREIRA *et al.*, 2011):

$$\theta = 1 - i_{\text{CL}_{\text{col}}}/i_{\text{GCE}} \quad (1)$$

Onde,  $i_{\text{CL}_{\text{col}}}$  é a corrente de pico obtida para o eletrodo  $\text{CL}_{\text{col}}/\text{GCE}$  (sendo  $\text{CL}_{\text{col}}$  com ou sem aquecimento) e  $i_{\text{GCE}}$  é a corrente de pico obtida com o GCE não modificado. O grau de recobrimento alcançado sem o tratamento térmico foi de  $\theta = 0,09$ , e após o tratamento térmico foi de  $\theta = 0,15$ , para concentração de  $\text{CL}_{\text{col}}$  de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pois em concentrações superiores maiores distorções do voltamograma foram observadas, conforme dados apresentados mais adiante. Esses valores mostram que o recobrimento da superfície é baixo, e, portanto, a reação de transferência de carga que envolve a sonda ocorre de forma semelhante como no eletrodo não modificado, com muito baixo impedimento. Neste caso o tunelamento de elétrons através do filme pode ser descartada (FERREIRA *et al.*, 2011) e provavelmente a sonda redox atinge o eletrodo através do grande espaço livre no filme de  $\text{CL}_{\text{col}}$  na superfície do eletrodo, como mostrado na Figura 43-B.

O grau de inibição do processo faradaico está intimamente relacionado com as propriedades eletroquímicas dos filmes que são depositados sobre a superfície do eletrodo. O comportamento do sistema quanto à transferência eletrônica na superfície do eletrodo foi investigada usando a CV e EIS. A Figura 48 mostra os voltamogramas cíclicos do imunossensor para detecção de cTnI após cada passo de montagem do imunossensor sobre a plataforma de CLcol/GCE. É possível visualizar no gráfico que a formação do filme de CL<sub>col</sub> sobre a superfície do GCE promove uma redução nas correntes de pico anódica ( $i_{pa}$ ) e catódica ( $i_{pc}$ ) para  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  em relação ao GCE não modificado (Figura 46), para o pico anódico a queda foi de 15% após o tratamento térmico. Em seguida, a adição de AuNP-PAH ao eletrodo modificado com CL<sub>col</sub> (Figura 48 - voltamograma a), acarreta em um aumento de 23% na resposta voltamétrica, evidenciando uma facilitação ao processo de transferência eletrônica promovido pela adição das nanoestruturas metálicas. Após a imobilização do anticorpo ab-cTnI ao eletrodo modificado com AuNP-PAH/CL<sub>col</sub>/GCE uma redução das correntes, cerca de 22%, e um aumento na separação dos picos para a sonda redox  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) foi observada (Figura 48 - voltamograma b), devido as características isolantes da proteína, como já discutido nos capítulos anteriores. A adsorção de glicina (gli) (Figura 48 - voltamograma c), a fim de bloquear os sítios de ligação não específicos também promoveu uma redução da corrente de 5,5% em relação ao eletrodo b da Figura 48 pelos mesmos motivos citados anteriormente. Após incubação do imunossensor gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE com 0,3 ng mL<sup>-1</sup> de cTnI (Figura 48 - voltamograma d) uma nova redução dos picos voltamétricos, cerca de 10%, foi observado devido a formação do imunocomplexo sobre a superfície do imunossensor (eletrodo d).

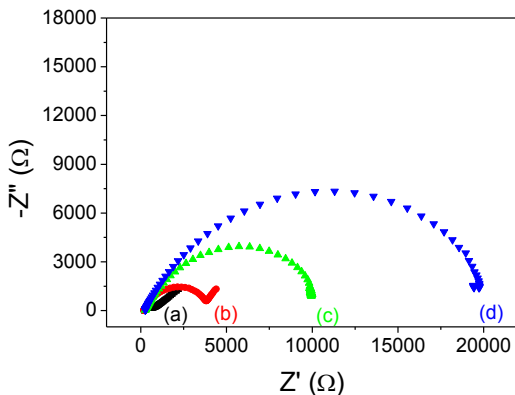
**Figura 48.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para: (a) AuNP-PAH/CLcol/GCE, (b) ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE, (c) gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE e (d)  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  cTnI: gli/ab-TnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



O mesmo processo pode ser mais adequadamente observado pelos espectros de impedância eletroquímica (Figura 49), onde essas alterações na forma das curvas correspondem a mudanças ocorridas no processo de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Na Figura 49-d podemos visualizar que o reconhecimento de cTnI pelo imunossensor promove um aumento bastante expressivo no valor  $R_{ct}$ . Este processo se deve à biointeração específica do anticorpo com o seu antígeno, tendo em vista que a proteína provoca um bloqueio parcial da superfície causando uma redução da transferência de carga na superfície do eletrodo.



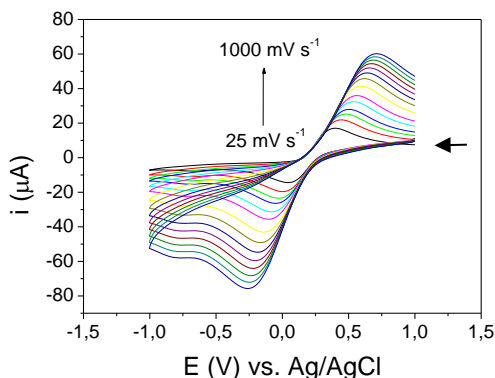
**Figura 49.** Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: (a) AuNP-PAH/CLcol/GCE, (b) ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE, (c) gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE e (d) 0,3 ng mL<sup>-1</sup> cTnI: gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>.



#### 6.1.4. Efeito da velocidade de varredura

Informações envolvendo os mecanismos eletroquímicos podem muitas vezes ser obtida pela relação entre a corrente de pico catódica/anódica e a velocidade de varredura para CV. O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta eletroquímica do par Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> para o eletrodo modificado com gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE é mostrado na Figura 50. De acordo com esta figura, com o aumento da velocidade de varredura, o valor de potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) deslocou-se para um valor mais positivo e o valor de potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ) deslocou-se em direção a valores mais negativos.

**Figura 50.** (A) Voltamogramas cíclicos para gly/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, com velocidade de varredura de 25 a 1000 mV s<sup>-1</sup>.



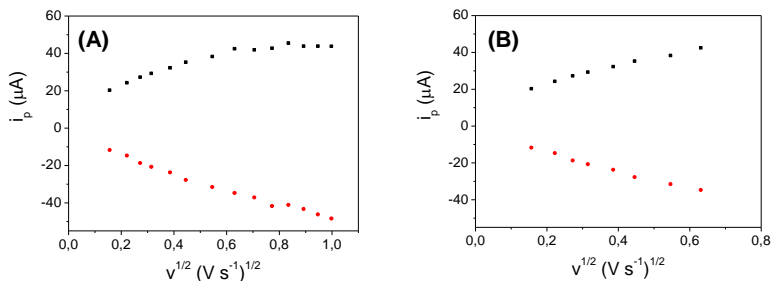
As correntes de pico anódicas ( $i_{pa}$ ) e catódicas ( $i_{pc}$ ) aumentam linearmente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura de 25-400 mV s<sup>-1</sup> (Figura 51), comprovando que o processo é controlado pela difusão das espécies eletroativas nessa faixa de velocidade, em valores maiores o comportamento deixou de ser linear (BARD e FAULKNER, 2001). A constante de transferência eletrônica ( $k_s$ ) foi calculada empregando a equação de Laviron (2) e (3) (LAVIRON, 1979):

$$\frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{v_a}{v_c} \quad (2)$$

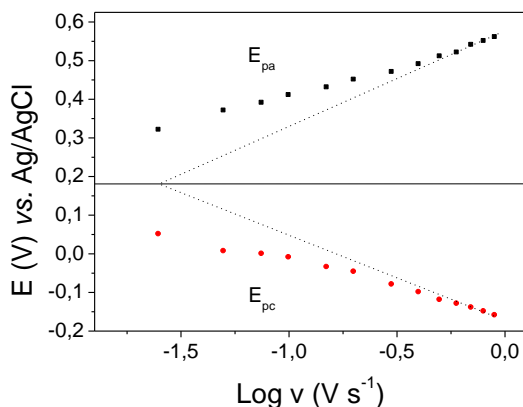
$$k_s = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = \frac{(1 - \alpha) n F v_a}{RT} \quad (3)$$

Onde  $R$  é a constante dos gases (8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>),  $F$  é a constante de Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>),  $T$  é a temperatura (298 K),  $n$  é o número de mols de elétrons transferidos na reação redox, e  $v_a$  e  $v_c$  são as velocidades de varredura em que o potencial em função do logaritmo da velocidade se interceptam. Baseado nos dados mostrados na Figura 52, os valores de  $\alpha$  e  $k_s$  foram estimados em 0,5 e 0,49 s<sup>-1</sup>, respectivamente, considerando  $v_a = v_c = 25$  mV s<sup>-1</sup> e  $n = 1$ .

**Figura 51.** Gráfico da corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) e catódico ( $i_{pc}$ ) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) em (A) 25 a 1000  $\text{mV s}^{-1}$  e em (B) 25 a 400  $\text{mV s}^{-1}$  para uma solução de PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



**Figura 52.** Gráfico de  $E_{pa}$  and  $E_{pc}$  vs. logaritmo da velocidade de varredura ( $v$ ) para os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 50.



### 6.1.5. Avaliação de parâmetros de construção e operação do imunossensor

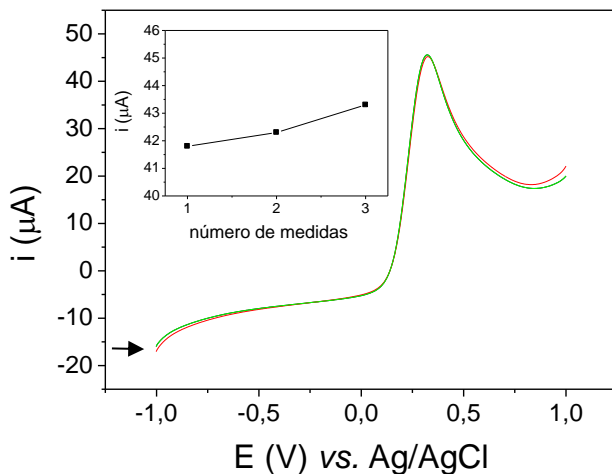
A fim de se obter as melhores condições de operação do imunossensor proposto, alguns parâmetros foram investigados utilizando a LSV e a EIS. A sonda redox usada como base para a avaliação dos parâmetros experimentais foi o par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Os

parâmetros avaliados foram: seleção da técnica eletroquímica, quantidade de  $CL_{col}$ , quantidade de AuNP-PAH, imobilização do anticorpo, constante de associação, tempo de incubação.

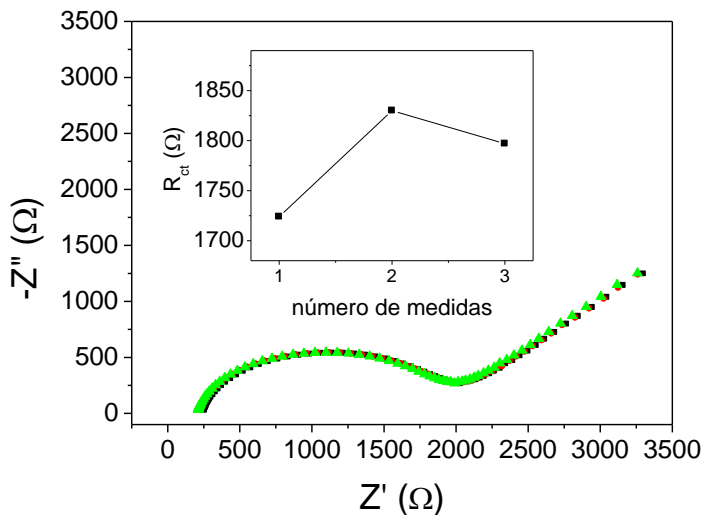
#### 6.1.5.1. Seleção de técnica eletroquímica

A fim de selecionar a melhor técnica para uso do imunossensor avaliou-se três diferentes técnicas eletroquímicas: a voltametria linear (LSV), a voltametria de onda quadrada (SWV) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Os critérios de seleção foram: a obtenção de um sinal expressivo para uso com um processo de inibição faradaico e, principalmente, a reprodutibilidade das respostas obtidas para cada técnica em relação ao sinal do pico base (na ausência de cTnI), evitando assim um falso resultado quando o imunossensor for incubado com o antígeno cTnI. Para isso, foram realizados três experimentos sucessivos com cada técnica em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ . A Figura 53 mostra os resultados obtidos com a LSV, sendo possível observar que o sinal mostrou um comportamento contante havendo pouca alteração do sinal de corrente entre as três medidas realizadas. O mesmo comportamento foi observado para a EIS (Figura 54). Já para a SWV (Figura 55), o sinal obtido para o mesmo sistema não se mostrou estável o que inviabiliza o seu uso para a detecção empregando o imunossensor. Com base nestes resultados, selecionou-se a LSV e a EIS para uso na detecção de cTnI empregando o imunossensor proposto.

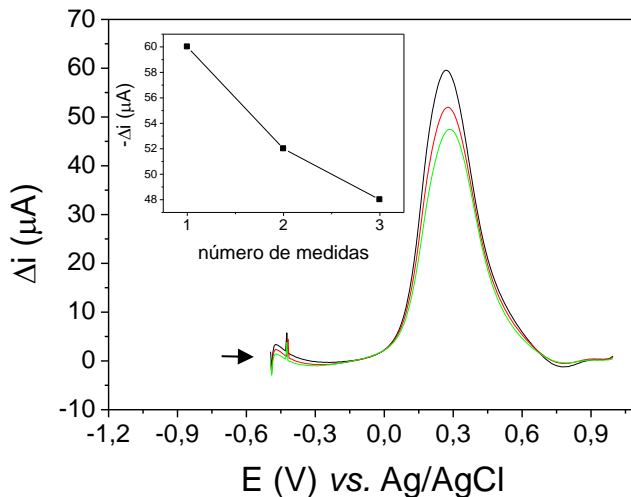
**Figura 53.** Voltamogramas lineares para três medidas consecutivas obtidas usando o imunossensor com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  na ausência de cTnI. Inserido: variação da resposta.



**Figura 54.** Diagramas de Nyquist para três medidas consecutivas obtidas com o imunossensor em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  na ausência de cTnI. Inserido: variação da resposta.



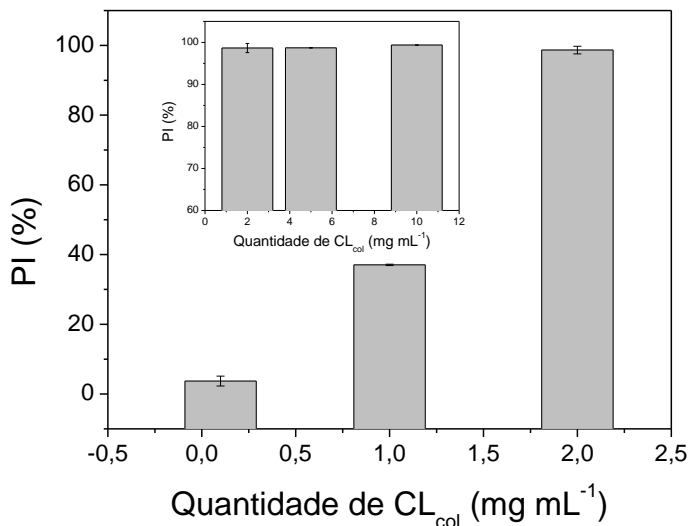
**Figura 55.** Voltamogramas de onda quadrada para três medidas consecutivas obtidas com o imunossensor em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  na ausência de cTnI, com frequência de 50 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 5 mV. Inseto: Variação da resposta.



#### 6.1.5.2. Quantidade de $\text{CL}_{\text{col}}$ e AuNP-PAH

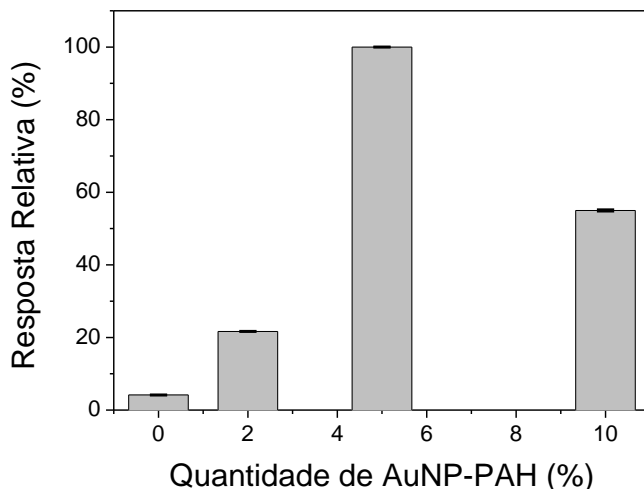
A fim de determinar a dependência da quantidade de  $\text{CL}_{\text{col}}$  na resposta do imunossensor, soluções de CL com diferentes concentrações ( $0,1$  a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram preparadas e depositadas sobre o GCE, empregando uma alíquota fixa de  $3 \mu\text{L}$  de solução. As respostas para o sistema  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  foram avaliadas por CV (Figura 56). A melhor resposta foi obtida empregando-se uma solução de concentração igual a  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . O critério usado para essa seleção foi o perfil do pico voltamétrico, ou seja, usou-se uma quantidade de  $\text{CL}_{\text{col}}$  que promove um recobrimento da superfície do GCE, porém não suficiente para isolar eletricamente o eletrodo. Acima de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  já foi observado uma supressão de 100% do sinal voltamétrico da sonda  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

**Figura 56.** Efeito da concentração de  $CL_{col}$  ( $0,1$  a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) sobre a resposta do sensor imerso em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  $7,5$ ) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



O efeito das AuNP-PAH sobre a resposta do sensor foi avaliado a partir de diferentes proporções de AuNP-PAH, para esse estudo a dispersão de AuNP-PAH foi concentrada nas seguintes razões (10x, 5x, 2x e 0x). A Figura 57 mostra os resultados das proporções de AuNP-PAH investigadas, sendo a resposta relativa medida em função de uma solução  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  $7,5$ ). Como apresentado, a corrente de pico catódica aumenta com o aumento da concentração atingindo um patamar máximo para uma razão de diluição de 5x, e para maiores valores de diluição a resposta para a sonda redox apresenta um decréscimo. Assim, a proporção de AuNP-PAH com diluição de 5x foi escolhida para os demais estudos.

**Figura 57.** Efeito da quantidade de AuNP-PAH em diferentes proporções (0 a 10x) na resposta da sonda redox obtidos por voltametria linear com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

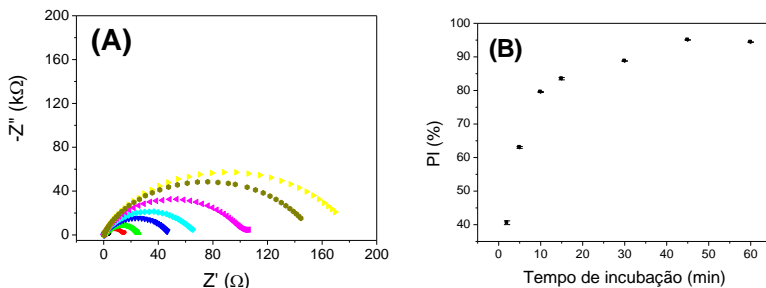


### 6.1.5.3. Tempo de incubação e constante de associação

O tempo de incubação reflete diretamente no tempo de diagnóstico, e, portanto é importante parâmetro de operação a ser avaliado. Para este estudo empregou-se uma faixa de 2 a 60 min de incubação. O tempo de incubação foi avaliado como o tempo necessário para gerar uma porcentagem de inibição da resposta da sonda redox significativa em uma região antes de uma supressão total do sinal. Os estudos foram realizados para incubação do imunossensor com  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  de cTnI (Figura 58). O tempo de incubação selecionado foi 10 min, pois a supressão de sinal gerado já é suficiente para acompanhar os eventos de formação do imunocomplexo.



**Figura 58.** (A) Diagrama de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para: gli/ab-cTnI/AuNP-PAH/CLcol/GCE para incubação com 0,3 ng mL<sup>-1</sup> cTnI em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, para avaliar o efeito do tempo de incubação (2 a 60 min). (B) Porcentagem de inibição em função do tempo.



A constante de associação aparente ( $k_{\text{ass}}^{\text{app}}$ ) para a formação do imunocomplexo foi obtida a partir dos dados da Figura 58, e usando a equação descrita por Symanska e colaboradores (2007). A relação entre os sítios de ligação ocupados ( $\theta$ ) e a mudança de  $R_{\text{ct}}$  é dada pela equação (4) (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2000):

$$\theta = 1 - \frac{R_{\text{ct}(0)}}{R_{\text{ct}(i)}} \quad (4)$$

Onde  $R_{\text{ct}(0)}$ , e  $R_{\text{ct}(i)}$  são as resistências à transferência de carga, na ausência (espectro base) e na presença do antígeno, respectivamente. No caso de isotermas de Langmuir  $\theta$  pode ser relacionada com a constante de associação de acordo com a equação (5) (ATKINS, 2001):

$$\theta = \frac{k_{\text{ass}} \times [\text{espécie}]}{1 + k_{\text{ass}} \times [\text{espécie}]} \quad (5)$$

Onde  $k_{\text{ass}}$  é a constante de associação e  $[\text{espécie}]$  é a concentração da molécula alvo. A linearização da isoterma de Langmuir fornece a equação (6):

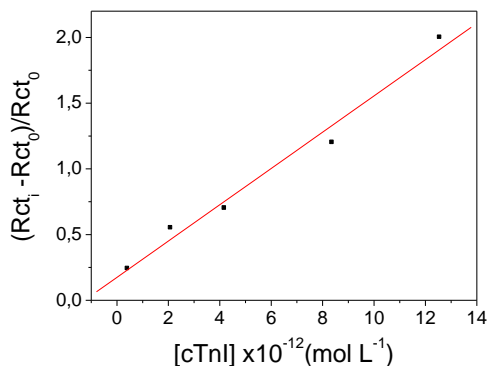
$$k_{\text{ass}} \times [\text{espécie}] = \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (6)$$

Combinando as equações (4) e (6) obtemos a equação (7):

$$k_{ass} \times [espécie] = \frac{R_{ct(i)} - R_{ct(0)}}{R_{ct(0)}} \quad (7)$$

O valor de  $R_{ct(i)}$  varia linearmente com a concentração de cTnI de  $4,18 \times 10^{-12}$  a  $1,26 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> (Figura 59). Portanto, a constante de associação pode ser calculada a partir da inclinação da curva de  $(R_{ct(i)} - R_{ct(0)})/R_{ct(0)}$  vs. [cTnI] (mol L<sup>-1</sup>). O valor aparente encontrado para a medida eletroquímica da constante de associação foi de  $1,38 \times 10^{11}$  L mol<sup>-1</sup>, o que indica que a formação do imunocomplexo é bastante favorecida.

**Figura 59.** Efeito da concentração de cTnI obtido na faixa de  $4,18 \times 10^{-12}$  a  $1,26 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> com tempo de incubação de 10 min em função da variação da resistência a transferência de carga obtidas por EIS em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>.

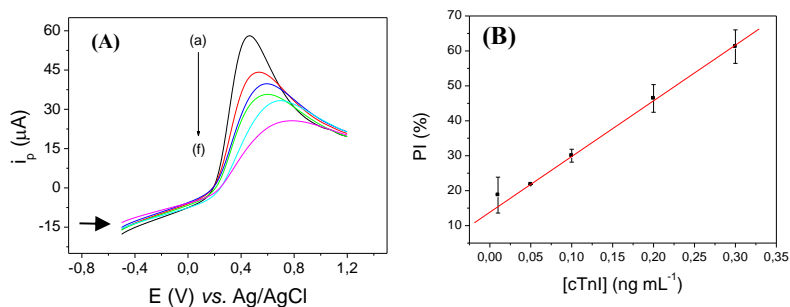


### 6.1.6. Curva de calibração para cTnI

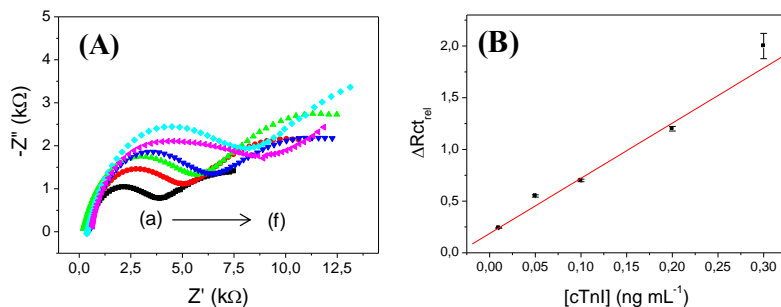
Sob condições otimizadas foram obtidas as curvas de calibração com concentrações crescentes de cTnI entre 0,01 a 0,3 ng mL<sup>-1</sup>, utilizando a LSV (Figura 60) em uma faixa de potencial de 0,6 a -0,6 V e a EIS (Figura 61) com frequências entre 100000 a 0,1 Hz. A equação de regressão linear obtida para a curva voltamétrica foi  $PI = 13,8 (\pm 0,28) + 159,5 (\pm 5,6) [cTnI]$ , com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,998, onde PI é a porcentagem de inibição do sinal voltamétrico (%) e [cTnI] é a concentração de troponina I (ng mL<sup>-1</sup>). A curva impedimétrica

apresentou uma equação de regressão linear de:  $\Delta Rct_{rel} = 0,19 (\pm 0,05) + 5,34 (\pm 0,4) [cTnI]$ , com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,990, onde  $\Delta Rct_{rel}$  é a variação da resistência transferência de carga em relação ao pico base ( $Rct_i - Rct_{base}/Rct_{base}$ ) e  $[cTnI]$  é a concentração de troponina I cardíaca ( $ng mL^{-1}$ ). O limite de detecção calculado (LOD = três vezes o desvio padrão do intercepto/inclinação) foi de  $0,005 ng mL^{-1}$  e  $0,02 ng mL^{-1}$  para a curva voltamétrica e impedimétrica, respectivamente. Portanto, para a curva impedimétrica admitiu-se o primeiro ponto da curva como LOD, tendo em vista o grande desvio apresentado. A OMS estabelece níveis clínicos de *cut-off* de  $0,01-0,1 ng mL^{-1}$  em cerca de 4-6 horas após o início da lesão miocárdica, e portanto, a faixa de trabalho obtida é suficiente para a identificação de um possível IAM.

**Figura 60.** (A) Voltamogramas lineares obtidos com velocidade de varredura de  $100 mV s^{-1}$  em: (a) PBS ( $0,01 mol L^{-1}$ , pH 7,5) contendo  $1,0 \times 10^{-2} mol L^{-1}$  de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  e imunossensor incubado com: (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 0,2, e (f)  $0,3 ng mL^{-1}$  de cTnI. (B) Curva de calibração para cTnI.



**Figura 61.** (A) Diagramas de Nyquist obtidos em modo de circuito aberto, com 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz com o imunossensor para cTnI em (a) PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) contendo 1,0×10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> e após incubação com: (b) 0,01, (c) 0,05, (d) 0,1, (e) 0,2, e (f) 0,3 ng mL<sup>-1</sup> de cTnI. (B) Curva de calibração para cTnI.

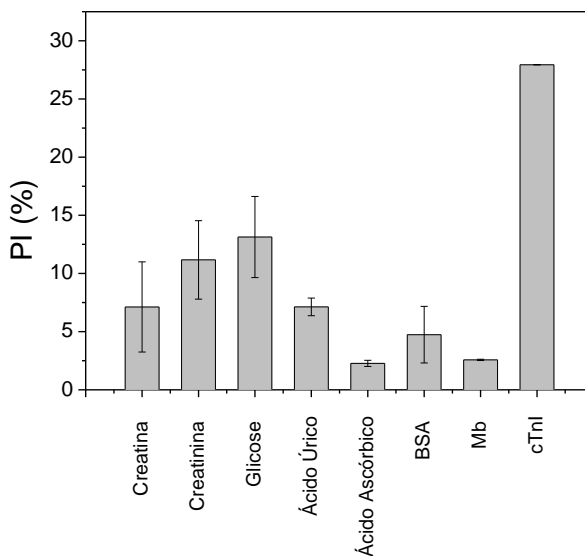


### 6.1.7. Estudo de possíveis composto interferentes e reprodutibilidade

Para investigar possíveis interferentes, um estudo foi realizado com compostos potencialmente interferentes e que são encontrados em amostras biológicas. Os resultados da Figura 62 mostram um baixo grau de interferência (inferior a 10 %) para a maioria das espécies testadas. Apenas creatinina e glicose causaram uma diminuição notável no pico de sinal, ligeiramente maior que 10%.

A reprodutibilidade do imunossensor proposto foi avaliada através da detecção de 0,05 ng mL<sup>-1</sup> de cTnI, sendo o desvio padrão relativo para seis medidas individuais igual a 8,1%, verificando a exatidão do imunossensor proposto.

**Figura 62.** Estudo de compostos potencialmente interferentes presentes em uma amostra de soro e detecção de  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  de cTnI: creatinina ( $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatina ( $10,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), glicose ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido úrico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), BSA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ), Mb ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ).



### 6.1.8. Aplicação do imunossensor na determinação de cTnI

A resposta analítica para o dispositivo desenvolvido foi obtida pela incubação do imunossensor em amostras de plasma sanguíneo contendo cTnI. Os resultados para as amostras analisadas estão apresentados na Tabela 9, os quais apresentaram um erro relativo de inferior a 15% em relação ao valor esperado.

**Tabela 9.** Determinação de cTnI em plasma sanguíneo, dados obtidos a partir do método voltamétrico

Amostra	[cTnI] detectada (ng mL <sup>-1</sup> )	Erro (%)
Plasma (0,05 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI)	0,056±0,007	12
Plasma (0,05 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI)	0,049±0,002	-2,0
Plasma (0,1 ng mL <sup>-1</sup> de cTnI)	0,095±0,019	-5,0

A Tabela 10 resume os resultados obtidos com imunossensores para cTnI com base em vários métodos e materiais anteriormente descritos na literatura. Pode ser observado na tabela que o imunossensor proposto apresenta um baixo LOD e curto tempo de diagnóstico.

**Tabela 10.** Comparação de diferentes imunossensores para cTnI baseado em vários métodos e materiais

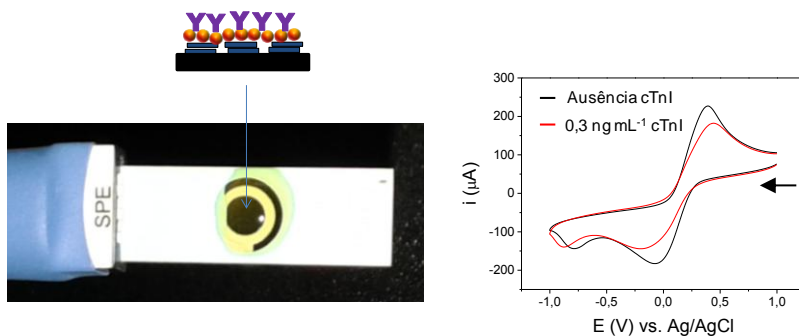
Método	Material/ Eletrodo	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Tempo de incubação (min)	Referência
EIS e CV	VACNF/ NEA	0,25– 10	0,2	60	(PERIYAKARUPPAN <i>et al.</i> , 2013)
SPR	TGF	0,5 – 20	0,25	30	(WEI <i>et al.</i> , 2003)
ELC	Ru-L/ GCE	0,01– 5,0	0,0045	60	(QI <i>et al.</i> , 2013)
ELC	AuNP/ Au	0,001 – 30	0,4x10 <sup>-3</sup>	60	(SHAN <i>et al.</i> , 2014)
SPR	TGF	0 – 160	0,068	5-8	(KWON <i>et al.</i> , 2011)
LSV e EIS	CL <sub>col</sub> /AuNP/ GCE	0,01 – 0,5	0,01	10	Este trabalho

ELC: eletroquimioluminescência; VACNF: nanofibras de carbono verticalmente alinhadas; NEA: arranjo de nanoeletrodos; Au: eletrodo de ouro; CV: voltametria cíclica; EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica; Ru-L: complexo de rutênio encapsulado em lipossomo; SPR: ressonância de plasma de superfície; TGF: filme de ouro; AuNP: nanopartículas de ouro; LSV: voltametria linear; CL<sub>col</sub>: cristal líquido colunar; GCE: eletrodo de carbono vítreo.

### 6.1.9. Teste preliminar para miniaturização do sistema

A Figura 63-A apresenta o mesmo sistema de três eletrodos (eletrodo de trabalho de carbono, eletrodo de referência um pseudo Ag/AgCl e um eletrodo auxiliar de carbono) descritos anteriormente, contudo esses três eletrodos encontram impressos sobre uma superfície. Essa classe de eletrodos impressos permite a miniaturização e portabilidade dos sistemas de sensoriamento desenvolvidos. Além de explorar outras configurações com diferentes materiais, também se pretende miniaturizar o sistema, e possivelmente transformá-lo em um teste descartável a partir do uso dos eletrodos impressos. O mesmo comportamento obtido com os eletrodos convencionais foi obtido com a plataforma impressa, ou seja, como mostrado na Figura 63-B o pico voltamétrico para sonda empregada reduziu-se na presença de cTnI.

**Figura 63.** (A) Imunossensor construído sobre um eletrodo impresso de carbono. (B) Detecção voltamétrica de  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  de cTnI em plasma sanguíneo.







## CAPITULO 7. CONCLUSÕES

No presente trabalho apresentou-se o desenvolvimento de três novos imunossensores eletroquímicos do tipo *label-free* contendo moléculas de CL e AuNP, os quais foram avaliados e aplicados na detecção de importantes biomarcadores cardíacos, sendo eles a Mb, cTnT e cTnI, que são empregados no diagnóstico de doenças cardíacas, como o IAM. Além da importância dos dispositivos desenvolvidos para área da saúde, também foi possível obter importantes informações eletroquímicas a respeito das plataformas desenvolvidas.

O primeiro imunossensor apresentado foi construído a partir da combinação de Br-Py como uma sonda voltamétrica, e AuNP estabilizadas em PEI. Essa plataforma foi empregada com sucesso na imobilização covalente de anticorpos ab-Mb, usando glicoxal como agente reticulante. Até onde sabemos esse foi um dos primeiros trabalhos publicados empregando moléculas de CL para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico. O dispositivo foi otimizado sendo que as melhores condições obtidas foram: 2  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) de Br-Py, 2  $\mu\text{L}$  da dispersão de AuNP-PEI, pH do tampão PBS igual a 7,5, frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 4 mV, o melhor tempo de incubação foi obtido em 10 min. O dispositivo desenvolvido mostrou simplicidade de construção, boa seletividade, boa reprodutibilidade (desvio padrão relativo de 4,3 %) e baixo LOD (6,3 ng  $\text{mL}^{-1}$ ) para detecção Mb, com uma faixa de trabalho de 10 a 72,8 ng  $\text{mL}^{-1}$ . Este imunossensor foi aplicado com sucesso na quantificação de Mb em amostras simuladas de soro sanguíneo a partir da inibição do sinal da sonda Br-Py, obtido por SWV. O estudo de interferência para compostos presentes em amostras de soro sanguíneo apresentou baixo nível de interferência (inferior a 10 %).

O segundo imunossensor descrito também usou como sonda redox a molécula Br-Py, que foi combinada com AuNP estabilizadas em silsesquioxano. Esta matriz foi então empregada para imobilização de anticorpos ab-cTnT por meio de interação eletrostática. Essa interação se deu por meio dos grupos carboxílicos do anticorpo carregados negativamente, com a superfície de AuNP-Sil, carregadas positivamente devido ao grupo picolínio do silsesquioxano. O dispositivo foi otimizado sendo que as melhores condições obtidas foram: 2  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) de Br-Py, 3  $\mu\text{L}$  da dispersão de AuNP-Sil, pH do tampão PBS igual a 7,5, frequência de 100 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 10 mV, o melhor tempo de incubação foi obtido em 10 min. Após

otimização dos parâmetros de construção e operação para detecção de cTnT, obteve-se uma curva de calibração para concentrações de cTnT de 0,1 a 0,9 ng mL<sup>-1</sup> com usando a inibição do sinal da sonda Br-Py, obtido por SWV, o LOD calculado de 0,08 ng mL<sup>-1</sup>. O dispositivo proposto foi empregado com sucesso na determinação de cTnT em amostras de soro simulado e de plasma sanguíneo. O imunossensor para cTnT apresentou baixo valor de LOD (0,08 ng mL<sup>-1</sup>) para esse biomarcador, com boa reprodutibilidade dos resultados (desvio padrão relativo de 8,0%), e baixos níveis de interferência (inferior a 10%) de outros compostos presentes em amostra biológicas.

O terceiro imunossensor abordou uma estratégia diferente de construção e operação. Para obtenção do mesmo empregou-se uma molécula de CL<sub>col</sub> e com transição para mesofase em baixa temperatura (30 °C). Inicialmente obteve-se um filme de CL<sub>col</sub> organizado sobre um GCE, e em uma segunda etapa foi formado um filme de AuNP estabilizadas em PAH, sendo esta plataforma empregada para imobilização covalente do anticorpo ab-cTnI, empregando EDC/NHS como reagente de ligação. Todos os estudos foram realizados empregado como sonda redox o par Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, sendo a inibição do sinal voltamétrico, obtido por LSV, ou então o aumento da R<sub>ct</sub>, obtido por EIS, usado para acompanhar os eventos de imunodeteção. Usando a CV determinou-se os valores de  $\alpha$  e  $k_s$ , que foram estimados em 0,5 e 0,49 s<sup>-1</sup>. Com auxílio da EIS obteve-se a constante de associação aparente para formação do imunocomplexo que foi igual a 1,38x10<sup>11</sup> L mol<sup>-1</sup>. O dispositivo foi otimizado sendo que as melhores condições obtidas foram: LSV e EIS como técnica eletroquímica, 3 µL (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) de CL<sub>col</sub>, 3 µL (pré-concentrada 5x) da dispersão de AuNP-PAH, pH do tampão PBS igual a 7,5, o melhor tempo de incubação foi obtido em 10 min. Após otimização dos parâmetros de construção e operação para detecção de cTnI, obteve-se uma curva de calibração para esse biomarcador cardíaco com faixa de trabalho de 0,01 a 0,3 ng mL<sup>-1</sup> com um LOD de 0,005 ng mL<sup>-1</sup> (LSV) e 0,01 ng mL<sup>-1</sup> (EIS), e então o dispositivo proposto foi empregado com sucesso na determinação de cTnI em amostras de soro simulado e de plasma sanguíneo. Estudos com possíveis compostos interferentes mostram baixos níveis de interferência (inferior a 10%) na detecção de cTnI, da mesma forma que o imunossensor demonstrou um baixo LOD para cTnI, com boa reprodutibilidade dos resultados (desvio padrão relativo de 8,1%).

Os resultados indicam que os imunossensores desenvolvidos são capazes de detectar níveis clínicos aceitáveis para os três

biomarcadores avaliados com baixos tempos de análise, aproximadamente 10 min, mostrando-se uma ferramenta útil para o diagnóstico de IAM. Indicando que as metodologias propostas poderiam ser utilizadas como uma abordagem complementar aos ensaios laboratoriais, ou até mesmo atuando como testes do tipo *point-of-care*, contribuindo dessa forma para a qualidade de vida de pacientes com possível suspeita de doenças cardíacas em hospitais e unidades de emergência, que poderiam obter um resultado com menor tempo de espera, o que aumentaria o sucesso dos tratamentos. Além disso, esta metodologia mostrou-se uma plataforma adequada para a imobilização de anticorpos, e, portanto, mostra um grande potencial para aplicação no desenvolvimento de novos dispositivos de imunossensoriamento que podem ser aplicados para diferentes fins clínicos.



**REFERÊNCIAS**

ADAM, D.; SCHUHMACHER, P.; SIMMERER, J.; HAUSSLING, L.; SIEMENSMEYER, K.; ETZBACH, K.H.; RINGSDORF, H.; HAARER, D. Fast Photoconduction in the Highly Ordered Columnar Phase of a Discotic Liquid Crystal. **Nature**, 371, 141–143, 1994.

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in Nano Materials: A Review. **Biotechnol. Adv.**, 30, 512–523, 2012.

ARCHER, J. Cardiac Biomarkers: a Review. **Comp. Clin. Path.**, 12, 121–128, 2003.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. PWN, Warsaw, pp. 827–829, 2001.

BANDYOPADHYAY, K., LIU, S.G., LIU, H., ECHEGOYEN, L. Ion Recognition at the Interface of Self-assembled Monolayer Bis-Thioctic Ester Derivate of Oligo(ethyleneglycols). **Chem. Eur. J.**, 6, 4385–4392, 2000.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods: Fundamental and Applications**. New York: Wiley, 2001.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. A Short Course, Fourth Edition. **Immunology**, John Wiley & Sons, Inc., 500 p., 2000.

BISOYI, H.K.; KUMAR, S. Discotic Nematic Liquid Crystals: Science and Technology. **Chem. Soc. Rev.**, 39, 264–285, 2010.

BOGDANOV, A.A.; KLIBANOV, A.L.; TORCHILIN, V.P. Protein Immobilization on the Surface of Liposomes Via Carbodiimide Activation in the Presence of N-hydroxysulfosuccinimide, **FEBS Lett.**, 231, 381–384, 1988.

BOUÇAS, R.I.; TRINDADE, E.S.; TERSARIOL, I.L.S.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)-like Fluorescence Assay to Investigate the Interactions of Glycosaminoglycans to Cells. **Anal. Chim. Acta**, 618, 218–226, 2008.

BRONDANI, D.; SOUZA, B.; SOUZA, B.S.; NEVES, A., VIEIRA, I.C. PEI-coated Gold Nanoparticles Decorated with Laccase: A New Platform for Direct Electrochemistry of Enzymes and Biosensing Applications. **Biosens. Bioelectron.**, 42, 242–247, 2013.

BUSHBY, R.J.; LOZMAN, O.R. Discotic Liquid Crystals 25 years on. **Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.**, 7, 343–354, 2002.

BUZEA, C.; PACHECO, I.I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. **Biointerphases**, 2, 1–103, 2007.

CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant Tissue-and Photosynthesis-based Biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008.

CAMPBELL, F.W.; COMPTON, R.G. The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: an Updated Review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 396, 241–259, 2010.

CARDOSO, M.M.B. Contribuição para o estudo da fase nemática biaxial em dendrímeros líquido-cristalinos termotrópicos. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física Tecnológica) – Instituto Superior Técnico, Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2007.

CARLTON, R.J.; HUNTER, J.T.; MILLER, D.S. ABBASI, R.; MUSHENHEIM, P.C.; TAN, L.N.; ABBOTT, N.L. Chemical and Biological Sensing Using Liquid Crystals, **Liq. Cryst. Rev.**, 1, 29–51, 2013.

CAVALCANTI, I.T.; SILVA, B.V.M.; PERES, N.G.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; GUEDES, M.I.F.; DUTRA, R.F.A. Disposable Chitosan-modified Carbon Fiber Electrode for Dengue Virus Envelope Protein Detection, **Talanta**, 91, 41–46, 2012.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. Mediated Biosensors. **Biosens. Bioelectron.**, 17, 441–456, 2002.

CHEN, X.; JIA, X.; HAN, J.; MA, J.; MA, Z. Electrochemical Immunosensor for Simultaneous Detection of Multiplex Cancer Biomarkers Based on Graphene Nanocomposites. **Biosens. Bioelectron.**, 50, 356–361, 2013.

CRISTIANO, E.; ECCHER, J.; BECHTOLD, I.H.; TIRONI, C.N.; VIEIRA, A.A.; MOLIN, F.; GALLARDO, H. Luminescent Columnar Liquid Crystals Based on Tristriazolotriazine. **Langmuir**, 28, 11590–12598, 2012.

D’ORAZIO, P. Biosensors in Clinical Chemistry. **Clin. Chim. Acta**, 334, 41–69, 2003.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas. **Quim. Nova**, 27, 623–630, 2004.

DEMUS, D., GOODBY, J.W.; GRAY, G.W.; SPIESS, H.-W.; VILL. V (eds). Handbook of Liquid Crystals, Wiley-VCH, Weinheim, 969 p. 1998.

EL-ATTAR, M.A.; ISMAIL, I.M.; GHONEIMA, M.M. Synthesis, Electrochemical, Spectrophotometric and Potentiometric Studies of Two Azo-Compounds Derived from 4-Amino-2-Methylquinoline in Ethanolic-Aqueous Buffered Solutions. **J. Braz. Chem. Soc.**, 23, 1523–1535, 2012.

ESCOSURA-MUÑIZA, A.; PAROLOA, C.; MERKOÇIA, A. Immunosensing Using Nanoparticles. **Mater. Today**, 13, 7–8, 2010.

FERREIRA, A.A.P.; FUGIVARA, C.S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A.V. Preparation and Characterization of Immunosensors for Disease Diagnosis. Biosensors for Health, Environment and Biosecurity. InTech, 2011.

GIROTTO, E. ECCHER, J.; VIEIRA, A.A.; BECHTOLD, I.H.; GALLARDO, H. Luminescent Columnar Liquid Crystals Based on 1,3,4-oxadiazole. **Tetrahedron**, 70, 3355–3360, 2014.

GOMES-FILHO, S.L.R.; DIAS, A.C.M.S.; SILVA, M.M.S.; SILVA, B.V.M.; DUTRA, R.F. A Carbon Nanotube-based Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin T. **Microchem. J.**, 109, 10–15, 2013.

GONZALEZ-MACIA, L.; SMYTHA, M.R.; MORRIN, A.; KILLARD, A.J. Enhanced Electrochemical Reduction of Hydrogen Peroxide on Silver Paste Electrodes Modified with Surfactant and Salt. **Electrochim. Acta**, 56, 4146–4153, 2011.

GÓRĘCKA, E.; JASTRZĘBSKA, M. Immobilization Techniques and Biopolymer Carriers. **Biotechnol. Food Sci.**, 75, 65–86, 2011.

GUILBAULT, G.G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York: M. Dekker, 453p., 1984.

GUO, H.; HE, N.; GE, S.; YANG, D.; ZHANG, J. MCM-41 Mesoporous Material Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Cardiac Troponin I by Anodic Stripping Voltammetry. **Talanta**, 68, 61–66, 2005.

GUO, S.; WANG, E. Synthesis and Electrochemical Applications of Gold Nanoparticles. **Anal. Chim. Acta**, 598, 181–192, 2007.

HAYWORTH, D. Protein Methods Library. Thermo Scientific. Disponível em <<http://www.piercenet.com/method/protein-methods-library>>. Acesso em: Novembro 2014.

HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.B.; GARCÍA, A.C. Review: Metal-nanoparticles Based Electroanalysis. **Electroanalysis**, 14, 1225–1235, 2002.

HU, Y.; HU, N.; ZENG, Z. Electrochemistry and Electrocatalysis with Myoglobin in Biomembrane-like Surfactant-polymer  $2C_{12}N^+PA^-$  Composite Films. **Talanta**, 50, 1183–1195, 2000.



HULANICKI, A.; GŁAB, S.; INGMAN, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. **Pure Appl. Chem.**, 63, 1247–1250, 1991.

JACOB, E.; UNGER, R.; HOROVITZ, A. N-Terminal Domains in Two-domain Proteins Are Biased to Be Shorter and Predicted to Fold faster than their C-terminal counterparts. **Cell rep.**, 3, 1051–1056, 2013.

JIANRONG C.; YUQING M.; NONGYUE H.; XIAOHUA, W.; SIJIAO, L. Nanotechnology and Biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 22, 505–518, 2004.

KARIMIAN, N.; VAGIN, M.; ZAVAR, M.H.A.; CHAMSAZ, M.; TURNER, A.P.F.; TIWARI, A. An Ultrasensitive Molecularly-imprinted Human Cardiac Troponin Sensor. **Biosens. Bioelectron.** 50, 492–498, 2013.

KELLY, S.M.; O'NEILL, M.; NALWA, H. S. (Ed.). Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices, Academic Press, 3366p. 2000.

KERMAN, K.; SAITO, M.; YAMAMURA, S.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors for Medical Applications. **Trends Anal. Chem.**, 27, 585–592, 2008.

KHUN, K.K.; MAHAJAN, A.; BEDI, R.K. Effect of Cationic/anionic Organic Surfactants on Evaporation Induced Self Assembled Tin Oxide Nanostructured Films. **Appl. Surf. Sci.**, 257, 2929–2934, 2011.

KONG, T.; SUL, R.; ZHANG, B.; ZHANG, Q.; CHENG, G. CMOS-compatible, Label-free Silicon-nanowire Biosensors to Detect Cardiac Troponin I for Acute Myocardial Infarction Diagnosis. **Biosens. Bioelectron.**, 34, 267–272, 2012.

KREBS, H.A. Chemical Composition of Blood Plasma and Serum. **Annu. Rev. Biochem.**, 19,409–430, 1950.

KWON, Y.-C.; KIM, M.-G.; KIM, E.M.; SHIN, Y.-B.; LEE, S.-K.; LEE, S.D.; CHO, M.J.; RO, H.S. Development of a Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor for the Rapid Detection of Cardiac Troponin I. **Biotechnol. Lett.**, 33, 921–927, 2011.

LAGERWALL, J.P.F.; SCALIA, G.A. New Era for Liquid Crystal Research: Applications of Liquid Crystals in Soft Matter Nano-, Bio- and Microtechnology. **Curr. Appl. Phys.**, 12, 1387–1412, 2012.

LASCHAT, S.; BARO, A.; STEINKE, N.; GIESSELMANN, F.; HÄGELE, C.; SCALIA, G.; JUDELE, R.; KAPATSINA, E.; SAUER, S.; SCHREIVOGEL, A.; TOSONI, M. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 46, 4832–4887, 2007.

LAVIRON, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of Diffusion Less Electrochemical Systems, **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.**, 101, 19–28, 1979.

LEE, W.; JUNG, J.; HAHN, Y.K.; KIM, S.K.; LEE, Y.; LEE, J.; LEE, T.; PARK, J.; SEO, H.; LEE, J.N.; OH, J.H.; CHOI, Y.; LEE, S.S. A Centrifugally Actuated Point-of-care Testing System for the Surface Acoustic Wave Immunosensing of Cardiac Troponin I. **Analyst**, 138, 2558–256, 2013.

LEI, K.F.; YOKI, E.; BUTT, K.C. Colorimetric Immunoassay Chip Based on Gold Nanoparticles and Gold Enhancement. **Microfluid Nanofluid**, 8, 131–137, 2010.

LEQUIN, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Clin. Chem.**, 51, 2415–2418, 2005.

LEWANDROWSKI, K.; CHEN, A.; JANUZZI, J. Cardiac Markers for Myocardial Infarction A Brief Review. **Am. J. Clin. Pathol.**, 118, 93–99, 2002.

LI, F.; YU, Y.; CUI, H.; YANG, D.; BIAN, Z. Label-free Electrochemiluminescence Immunosensor for Cardiac Troponin I Using Luminol Functionalized Gold Nanoparticles as a Sensing Platform. **Analyst**, 138, 1844–1850, 2013.

LI, Y.; SCHLUESENER, H.J.; XU, S. Gold Nanoparticle-based Biosensors. **Gold Bulletin**, 43, 29–41, 2010.

LIANG, R.; FAN, L.; HUANG, D.; QIU, J. A Label-free Amperometric Immunosensor Based on Redox-active Ferrocene-branched Chitosan/multiwalled Carbon Nanotubes Conductive Composite and Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, 23, 719–727, 2011.

LOYPRASERT, S.; HEDSTRÖMA, M.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P.; MATTIASSON, B. Sub-attomolar Detection of Cholera Toxin Using a Label-free Capacitive Immunosensor. **Biosens. Bioelectron.**, 25, 1977–1983, 2010.

MCCORD, J.K. Is Myoglobin Useful for Assessment of Myocardial Infarction? American College of Cardiology, **2011**. Disponível em: <<http://www.cardiosource.org/>>. Acesso em: Novembro 2014.

MANSUR, A.P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arq. Bras. Cardiol.**, 99, 755–761, 2012.

MARTIN, N.H. The Immunoglobulins: A Review. **J. clin. Path.**, 22, 117-131, 1969.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1451–1463, 2007.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Anal. Sci.**, 20, 1113–1126, 2004.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Review of the Use of biosensors as Analytical Tools in the Food and Drink Industries. **Food Chem.**, 77, 237–256, 2002.

MENDES, R.K.; FERREIRA, D.C.M; CARVALHAL, R. F.; PERONI, L.A.; STACH-MACHADO, D.R.; KUBOTA, L.T. Development of an Electrochemical Immunosensor for *Phakopsora pachyrhizi* Detection in the Early Diagnosis of Soybean Rust. **J. Braz. Chem. Soc.**, 20, 795–801, 2009.

MENDIS, S.; THYGESEN, K.; KUULASMAA, K.; GIAMPAOLI, S.; MAHONEN, M.; NGU BLACKETT, K.; LISHENG, L. World Health Organization Definition of Myocardial Infarction: 2008–09 revision. **Int. J. Epidemiol.**, 40, 139–146, 2011.

MICHELI, L.; GRECCO, R.; BADEA, M.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. An Electrochemical Immunosensor for Aflatoxin M1 Determination in Milk Using Screen-printed Electrodes. **Biosens. Bioelectron.**, 21, 588–596, 2005.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors-Classification, Characterization and New Trends. **Acta Chim. Slov.**, 5, 109–120, 2012.

MOREIRA, F.T.C.; DUTRA, R.A.F.; NORONHA, J.P.C.; GORETI, M.; SALES, F. Electrochemical Biosensor Based on Biomimetic Material Formyoglobin Detection. **Electrochim. Acta**, 107, 481– 487, 2013.

MOREIRA, F.T.C.; DUTRA, R.A.F.; NORONHA, J.P.C.; SALES, M.G.F. Artificial Antibodies for Troponin T by its Imprinting on the Surface of Multiwalled Carbon Nanotubes: Its Use as Sensory Surfaces. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 4760–4766, 2011.

OLIVEIRA, N.M.P. Biossensor para detecção do antigénio específico da próstata. Dissertação (Mestre em Biologia Molecular e Celular). 2011. 88f. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2011.

OYAMA, M.A. Using Cardiac Biomarkers in Veterinary Practice. **Vet. Clin. Small Anim.**, 43, 1261–1272, 2013.

PATEL, N.; DAVIES, M.C.; HARTSHORNE, M.; HEATON, J.R.; C.J.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M. Immobilization of Protein

Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, 13, 6485–6490, 1997.

PERIYAKARUPPAN, A.; GANDHIRAMAN, R.P.; MEYYAPPAN, M.; KOEHNE J.E. Label-free Detection of Cardiac Troponin I Using Carbon Nanofiber Based Nanoelectrode Arrays. **Anal. Chem.**, 85, 3858–3863, 2013.

QI, H.; QIU, X.; XIE, D.; LING, C.; GAO, Q.; ZHANG, C. Ultrasensitive Electrogenerated Chemiluminescence Peptide-Based Method for the Determination of Cardiac Troponin I Incorporating Amplification of Signal Reagent Encapsulated Liposomes. **Anal. Chem.**, 85, 3886–3894, 2013.

QURESHI, A.; GURBUZ, Y.; NIAZI, J.H. Biosensors for Cardiac Biomarkers Detection: A review. **Sens. Actuators B**, 171, 62–76, 2012.

RAJESH; SHARMA, V.; TANWAR, V.K.; MISHRA, S.K.; BIRADAR, A.M. Electrochemical Impedance Immunosensor for the Detection of Cardiac Biomarker Myoglobin (Mb) in Aqueous Solution **Thin Solid Films**, 519, 1167–1170, 2010.

RAMÍREZ, N.B.; SALGADO, A.M.; VALDMAN, B. The Evolution and Developments of Immunosensors for Health and Environmental Monitoring: Problems and Perspectives. **Braz. J. Anal. Chem. Eng.**, 26, 227–249, 2009.

RAO, S.V.; ANDERSON, K.W.; BACHAS, L.G. Fundamental Review Oriented Immobilization of Proteins. **Mikrochim. Acta**, 128, 127–143, 1998.

RHIEU, S.Y.; LUDWIG, D.R.; SIU, V.S.; TAYHAS, G.; PALMORE, R. Direct Electrochemistry of Cytochrome P450 27B1 in Surfactant Films. **Electrochem. Commun.**, 11, 1857–1860, 2009.

RICCARDI, C.S., COSTA, P.I., YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Quím. Nova**, 25, 77–85, 2001.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G.A. Review of Experimental Aspects of Electrochemical Immunosensors, **Electrochim. Acta**, 84, 74–83, 2012.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCI, G.A Review on Novel Developments and Applications of Immunosensors in Food Analysis. **Anal. Chim. Acta**, 605, 111–129, 2007.

RUSLING, J.F.; NASSAR, A.-E.F. Enhanced Electron Transfer for Myoglobin in Surfactant Films on Electrodes. **J. Am. Chem. Soc.**, 115, 11891–11897, 1993.

RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. **Biomacromolecules**, 8, 1775-1789, 2007.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 30, 489–511, 2012.

SHAN, M.; LI, M.; QIU, X.; QI, H.; GAO, Q.; ZHANG, C. Sensitive Electrogenerated Chemiluminescence Peptide-based Biosensor for the Determination of Troponin I with Gold Nanoparticles Amplification. **Gold Bull.**, 47:57–64, 2014.

SHAN, W.; LIU, H.; SHI, J.; YANG, L.; HU, N. Self-assembly of Electroactive Layer-by-layer Films of Heme Proteins with Anionic Surfactant Dihexadecyl Phosphate. **Biophys. Chem.**, 134, 101–109, 2008.

SILVA, L.M.C. Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para Fenol e Uréia com Foco na Aplicação Ambiental. 2011. 159f. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

SILVA, P.S.; GASPARINI, B.C. MAGOSSO, H.A., SPINELLI, A. Gold Nanoparticles Hosted in a Water-soluble Silsesquioxane Polymer Applied as a Catalytic Material onto an Electrochemical Sensor for Detection of Nitrophenol Isomers. **J. Hazard. Mater.**, 273, 70-77, 2014A.

SILVA, T.R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I.C. Electrochemical Sensor Based on Gold Nanoparticles Stabilized in

Poly(allylamine hydrochloride) for Determination of Vanillin. **Electroanalysis**, 2014B.

SOUZA, E.; KUBOTA, L.T.; YAMAMOTO, Y.I. Alguns Aspectos de Imunoensaios Aplicados à Química Analítica. **Quim. Nova**, 22, 57–63, 1999.

SUN, X.; DONG, S.; WANG, E. One-step Preparation of Highly Concentrated Well-stable Gold Colloids by Direct Mix of Polyelectrolyte and HAuCl<sub>4</sub> Aqueous Solutions at Room Temperature. **J. Colloids Interface Sci.**, 288, 301–303, 2005.

SUPRUN, E.; BULKO, T.; LISITSA, A.; GNEDENKO, O.; IVANOV, A.; HUMYANTSEVA, V.; ARCHAKOV, A. Electrochemical Nanobiosensor for Express Diagnosis of Acute Myocardial Infarction in Undiluted Plasma. **Biosens. Bioelectron.**, 25, 1694–1698, 2010.

SUPRUN, E.V.; SHILOVSKAYA, A.L.; LISITSA, A.V.; BULKO, T.V.; SHUMYANTSEVA, V.V. ALEXANDER I. ARCHAKOV. Electrochemical Immunosensor Based on Metal Nanoparticles for Cardiac Myoglobin Detection in Human Blood Plasma. **Electroanalysis**, 23, 1051–1057, 2011.

SZYMANSKA, I.; RADECKA, H.; RADECKI, J.; KALISZAN, R. Electrochemical Impedance Spectroscopy for Study of Amyloid  $\beta$ -peptide Interactions with (–) Nicotine Ditartrate and (–) Cotinine. **Biosens. Bioelectron.**, 22, 1955–1960, 2007.

TARAKANOVA, Y.N.; DMITRIEV, D.A.; MASSINO, Y.S.; SMIRNOVA, M.B.; SEGAL, O.L.; FARTUSHNAYA, O.V.; YAKOVLEVA, D.A.; KOLYASKINA, G.I.; LAVROV, V.F.; DMITRIEV, A.D. Effect of Conditions of Monoclonal Antibody Adsorption on Antigen-binding Activity. **Appl. Biochem. Micro.**, 48, 506–512, 2012.

TEIXEIRA, A.M.; BORGES, G.F. Creatine Kinase: Structure and Function. **Braz. J. Anal. Chem. Biomotr.**, 6, 53–65, 2012.

THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classifications. **Biosens. Bioelectron.**, 16, 121–31, 2001.

TSCHERSKE, C. Amphotropic Liquid Crystals. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, 7, 355–370, 2002.

WANG, W.; SINGH, S.; ZENG, D.L.; KING, K.; NEMA, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. **J. Pharm. Sci.**, 96, 1–26, 2007.  
WEI, J.; MU, Y.; SONG, D.; FANG, X.; LIU, X.; BU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; DING, J.; WANG, W.; JIN, Q.; LUO, G. Novel Sandwich Immunosensing Method for Measuring Cardiac Troponin I in Sera. **Anal. Biochem.**, 321, 209–216, 2003.

WESTPHAL, E. Síntese e caracterização de novos cristais líquidos discóticos foto-isomerizáveis. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2009.

WHO – World Health Organization. Cardiovascular Diseases (CVDs), Fact sheet n° 317. September 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>. Acesso em: Outubro 2014.

WILLNER, I.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Electroanalytical Applications of Metallic Nanoparticles and Supramolecular Nanostructures. **Electroanalysis**, 23, 13–28, 2011.

XIA, W.S.; HUANG, C.H.; YE, X. Z.; LUO, C.P.; GAN, L.B.; LIU, Z.F. Photochromic and Electrochemical Properties of a Novel Azo Pyridinium Compound and Its Langmuir-Blodgett Films. **J. Phys. Chem.**, 100, 2244–2248, 1996.

XU, Y.; HU, C.; HU, S. Single-chain Surfactant Monolayer on Carbon Paste Electrode and Its Application for the Studies on the Direct Electron Transfer of Hemoglobin. **Bioelectrochemistry**, 74, 254–259, 2009.

YAN LI, Y.; CHENG, P.; GONG, J.; FANG, L. DENG, J. LIANG, W.; ZHENG, J. Amperometric Immunosensor for the Detection of Escherichia coli O157:H7 in Food Specimens. **Anal. Biochem.**, 421, 227–233, 2012.



YANG, M.; GONG, S. Immunosensor for the Detection of Cancer Biomarker Based on Percolated Graphene Thin Film. **Chem. Commun.**, 46, 5796–5798, 2010.

YANG, G.-J.; QU, X.-L.; SHEN, M.; WANG, C.-Y.; QU, Q.-S.; HU, X.-Y. Preparation of Glassy Carbon Electrode Modified by Hydrophobic Gold Nanoparticles and Its Application for the Determination of Ethamsylate in the Presence of Cetyltrimethylammonium Bromide. **Sens. Actuators B**, 128, 258–265, 2007.

YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. **Sensors**, 10, 4558–4576, 2010.

YUAN, S.; CHEN, W.; HU, S.T. Fabrication of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles/Surfactant Polymer Complex Film on Glassy Carbon Electrode and Its Application to Sensing Trace Dopamine. **Mater. Sci. Eng. C**, 25, 479–485, 2005.

ZAPP, E.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SOUZA, B.; VIEIRA, I.C. Liquid Crystal and Gold Nanoparticles Applied to Electrochemical Immunosensor for Cardiac Biomarker. **Biosens. Bioelectron.**, 59, 127–133, 2014A.

ZAPP, E.; SILVA, P.S.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C. Troponin T Immunosensor Based on Liquid Crystal and Silsesquioxane-Supported Gold Nanoparticles. **Bioconjugate Chem.**, 25, 1638–1643, 2014B.

ZHAO, L.; SUN, L.; CHU, X. Chemiluminescence Immunoassay. **Trends Anal. Chem.**, 28, 404–415, 2009.

ZHAO, X.; PAN, F.; GARCIA-GANCEDO, L.; FLEWITT, A.J.; ASHLEY, G.M.; LUO, J.; LU, J.R. Interfacial Recognition of Human Prostate-specific Antigen by Immobilized Monoclonal Antibody: Effects of Solution Conditions and Surface Chemistry. **J. R. Soc. Interface**, 9, 2457–2467, 2012.