



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RITA DE CASSIA SILVA CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA PARA  
DETECÇÃO DE MIOGLOBINA EMPREGANDO RESSONÂNCIA DE  
PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE E MEDIDAS ELETROQUÍMICAS**

SÃO LUÍS-MA

2016

**RITA DE CASSIA SILVA CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO DE  
MIOGLOBINA EMPREGANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE  
E MEDIDAS ELETROQUÍMICAS**

SÃO LUÍS - MA  
2016

**RITA DE CASSIA SILVA CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO DE  
MIOGLOBINA EMPREGANDO RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE  
E MEDIDAS ELETROQUÍMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

SÃO LUÍS – MA  
2016

Carvalho, Rita de Cassia Silva.

Desenvolvimento de uma nova plataforma para detecção de mioglobina empregando ressonância de plásmons de superfície e medidas eletroquímicas / Rita de Cassia Silva Carvalho. - 2016.

84 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, Sao Luis, 2016.

Orientador(a): Flávio Santos Damos.

Coorientador(a): Rita de Cássia Silva Luz.

1. Imunossensor. 2. Infarto agudo do miocárdio. 3. Mioglobina. 4. Monocamada auto-organizada. I. Damos, Flávio Santos. II. Luz, Rita de Cássia Silva. III. Título.

CDU 543.1:616.1

“A persistência é o menor caminho do êxito”.  
(Charles Chaplin)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, auxílio e fortaleza em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela excelente orientação e amizade.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Silva Luz, pelas significativas contribuições ao longo deste trabalho.

À minha família pelo apoio e compreensão, em especial ao meu filho Davi, meu esposo Alisson e minha querida mãe Maria, fontes de incentivo e força para seguir sempre em frente.

A todos os colegas do Grupo de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos pelo companheirismo, incentivo e cooperação.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQUIM) pela oportunidade.

Aos órgãos de fomento CNPq (476401/2008-9; 305865/2013-7), FAPEMA (UNIVERSAL-00753/14) e INCT Bioanalítica, cujo apoio financeiro subsidiou parcialmente os custos desta dissertação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas como importante causa de morbidade e mortalidade prematura em todo o mundo. O diagnóstico rápido das DCVs é extremamente importante para garantir a sobrevivência do paciente. A mioglobina (Mb), por seu baixo peso molecular, é rapidamente liberada no organismo, resultando em elevada sensibilidade de forma a se constituir como precioso biomarcador de infarto agudo do miocárdio (IAM). Portanto, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma plataforma eficiente, sensível e estável para a imobilização de anticorpos (Ac) de mioglobina aplicável ao monitoramento de antígenos (Ag) de mioglobina empregando ressonância de plásmons de superfície (SPR). Neste sentido, as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e impedância eletroquímica foram empregadas na investigação de monocamadas auto-organizadas (SAMs) simples e mistas de ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA) e ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A SAM mista MPA/MUA de proporção 3:1 apresentou baixa resistência à transferência de carga e elevada cobertura de superfície. Com o propósito de investigar a capacidade da SAM de MPA/MUA frente à imobilização de Ac-Mb foram feitos estudos comparativos para a avaliação da interação da do Ac-Mb com a SAM de MPA/MUA bem como para a SAM de MPA/MUA modificada com dendrímero de poliamidoamina de geração 5 (PAMAM G5). Em seguida, após a escolha da plataforma mais sensível, fez-se os estudos da interação do Ac-Mb com diferentes concentrações do Ag-Mb (0,001; 0,5; 0,8; 1 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) através de imunoenensaio em formato “*sanduíche*”. A estrutura tridimensional do dendrímero PAMAM G5 favoreceu a amplificação do sinal de SPR, pois concede uma maior área acessível para a imobilização do anticorpo da Mb. O imunoenensaio em sanduíche amplificou o sinal de interação Ac/Ag da Mb, apresentando vantagens significativas na sensibilidade do imunossensor. Os resultados mostram que foi possível desenvolver um imunossensor capaz de detectar baixas concentrações (0,00067  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do Ag-Mb. Neste sentido, o sistema proposto apresenta grande potencial alternativo de diagnóstico precoce, simples e rápido do IAM.

**Palavras- chave:** Infarto Agudo do Miocárdio, Mioglobina, Imunossensor e Monocamada Auto-Organizada.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are considered as an important cause of morbidity and premature mortality worldwide. Rapid diagnosis of CVD is extremely important to ensure the survival of the patient. Myoglobin (Mb), for its low molecular weight is quickly released in the body, resulting in high sensitivity in order to be as valuable biomarker of acute myocardial infarction (AMI). Therefore, this study aims to develop an efficient platform, sensitive and stable for the immobilization of antibodies (Ab) myoglobin applicable to the monitoring of antigens (Ag) myoglobin using surface plasmon resonance (SPR). In this sense, the cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and impedance spectroscopy were used in self-assembled monolayers research (SAMs) simple and mixed acid 11-mercaptoundecanoic (MUA) and 3-mercaptopropionic acid (MPA). The mixed SAM MPA / MUA 3: 1 ratio showed low resistance to charge transfer and high surface coverage. In order to investigate the SAM capacity MPA / MUA opposite the locking Ac-MB were made comparative studies for the evaluation of the interaction of Ac-MB SAM MPA / MUA well as for SAM MPA / MUA modified polyamidoamine dendrimer of generation 5 (G5 PAMAM). Then, after choosing the more sensitive platform made up AC-Mb interaction studies with different concentrations of Ag-Mb (0,001; 0,5; 0,8; 1 and 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) through immunoassay in a "sandwich". The three-dimensional structure of the dendrimer PAMAM G5 favored amplification of SPR signal as grants most accessible area for the immobilization of antibody Mb. The sandwich immunoassay amplified the interaction signal Ac / Ag Mb, with significant advantages in sensitivity immunosensor. The results show that it was possible to develop an immunosensor capable of detecting low concentrations (0.00067  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) Ag-Mb. In this sense, the proposed system has great potential alternative to early diagnosis, simple and fast IAM.

**Keywords:** Acute myocardial infarction, Myoglobin, Imunosensor and Self-Assembled Monolayer.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Área geométrica do eletrodo (cm <sup>2</sup> )
Ac	Anticorpos
Ag	Antígenos
Au	Sítio de adsorção ou superfície de ouro
c	Concentração mol.L <sup>-1</sup>
DCV	Doença Cardiovascular
$\Delta E$	Intervalo de potencial
$\Delta\theta_{\text{SPR}}$	Varição do ângulo de SPR
E	Potencial em volts (V)
Ea	Eletrodo auxiliar
ECG	Eletrocardiograma
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Er	Eletrodo de referência
Et	Eletrodo de trabalho
$\epsilon_p$	Constante dielétrica do prisma
$\epsilon_m$	Constante dielétrica do ambiente
$\epsilon_4$	Constante dielétrica do meio
$\epsilon_r$	Parte real da constante dielétrica do filme de ouro
F	Constante de Faraday
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
$K_{\text{OPS}}$	Vetor onda da onda de plásmons de superfície ou constante de propagação da onda de plásmons de superfície
$k_t$	Constante de rearranjo molecular
$k_x$	Vetor onda da luz incidente
$\lambda$	Comprimento de onda da luz incidente e da onda de plásmons de superfície
3-MPA	Ácido 3-Mercaptopropiônico
11-MUA	Ácido 11-Mercapto-undecanóico
Mb	Mioglobina
n	Número de elétrons
nm	Nanometro
NHS	N-hidroxisuccinimida
OPS	Ondas de Plásmons de Superfície
PAMAM G5	Poliamidoamina de geração 5
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS	Plásmons de Superfície
Q	Carga associada com a redução de espécies na superfície
DR	Dessorção Redutiva
Rte	Resistência à transferência de elétrons
SAMs	Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs, do inglês <i>Self-Assembled Monolayers</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPR	Ressonância de Plásmom de Superfície (SPR do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
UME	Ultramicroeletrodo

$\Gamma$	Cobertura de superfície total (número de moléculas por área)
$\theta$	Ângulo de incidência da luz
$\theta_c$	Ângulo crítico
$\theta_{SPR}$	Ângulo de SPR
$v$	Velocidade de varredura
$\omega$	Frequência angular da luz incidente

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema geral de funcionamento de um biossensor. .... 26
- Figura 2:** Esquema de funcionamento de um imunossensor, bem como as estruturas representativas de anticorpos e antígenos com seus respectivos epítomos, responsáveis pelas reações de afinidade..... 28
- Figura 3:** Configurações de Kretschmann (à esquerda) e de Otto (à direita) utilizando o método de reflexão total. .... 30
- Figura 4:** Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica. .... 31
- Figura 5:** a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência de energia da onda incidente para a onda evanescente (OPS); (b) Curvas de refletância na ausência ( $\theta_{SPR1}$ ) e presença ( $\theta_{SPR2}$ ) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o  $\theta_{SPR}$  (dado em mDA -miligráus de ângulo) e o tempo..... 32
- Figura 6:** Esquema de um sensograma de SPR para a adsorção de uma proteína numa superfície metálica. A mudança no valor do ângulo de SPR em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção. Onde IR – intensidade da radiação refletida e mDA – miligráus de ângulo. .... 33
- Figura 7:** Representação esquemática da formação de uma monocamada a partir de uma solução de alcanotíóis..... 35
- Figura 8:** Esquema de imobilização covalente de uma proteína e seu anticorpo sobre uma SAM em superfície de ouro, através da ativação desta pela adição de uma mistura aquosa contendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). .... 39
- Figura 9:** Representação esquemática da distribuição de moléculas de alcanotíóis 11-MUA e 3-MPA na composição de uma monocamada auto-organizada mista em superfície de ouro. . 40
- Figura 10:** Voltamograma Cíclico típico, obtido para o eletrodo de ouro em solução 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $\nu$  de 50 mV s<sup>-1</sup>,  $\Delta E$  de -0,2 a 1,5 V vs Ag/AgCl..... 47
- Figura 11:** Fórmulas estruturais dos alcanotíóis utilizados para a formação das monocamadas auto-organizadas: a) ácido 3-mercaptopropiônico e b) ácido 11-mercaptopundecanóico..... 48
- Figura 12:** Instrumentação utilizada nos estudos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Em (a) Potenciostato/galvanostato da Autolab (modelo PGSTAT 128N), em (b), da esquerda para direita, eletrodos de trabalho (0,07065 cm<sup>2</sup> de área), auxiliar e referência utilizados..... 49
- Figura 13:** Espectrômetro de SPR Autolab Springle Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas. Em (a) espectrômetro de SPR Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas e em (b) disco de ouro utilizado como substrato nas análises colocado sobre o prisma de vidro. .... 49
- Figura 14:** Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo não modificado (curva 1) e eletrodo modificado com as SAMs simples e mistas formadas com os tíóis: 3-MPA (curva 2), 11-MUA (curva 5), 3-MPA/11-MUA 3:1 (curva 3), 3-MPA/11-MUA 1:3 (curva 4). Os

voltamogramas foram obtidos em 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de ferricianeto em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl, v 50mVs<sup>-1</sup> e ΔE de -0.1 a 0.5 V vs. Ag/AgCl.....57

**Figura 15:** Diagrama de Nyquist (gráfico Z' vs. Z'') para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica realizadas para caracterização das SAMs. A sonda redox utilizada foi hexacianoferrato de potássio 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A amplitude foi 10 mV e a faixa de frequência de 0,1 a 105 Hz. Todas as medidas foram obtidas em potencial aplicado. ....59

**Figura 16:** Medidas de DR feitas através da técnica de VPD realizada em eletrodo não modificado e modificado com as SAMs simples e mistas após tempo de interação de 24 horas. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KOH, v de 25 mV s<sup>-1</sup>, 50 mV de amplitude de pulso e ΔE de -0,2 a -1,3V vs Ag/AgCl..... 61

**Figura 17:** Sensogramas e gráfico com valores médios de deslocamento de ângulo de SPR referentes à imobilização de antígenos da Mb (50 μg.mL<sup>-1</sup>). .... 63

**Figura 18:** Sensogramas referentes à associação do anticorpo da Mb a partir de soluções de diferentes concentrações: 0,5 μg mL<sup>-1</sup> (curva 1); 2,5 μg mL<sup>-1</sup> (curva 2), 5 μg mL<sup>-1</sup> (curva 3), 10 μg mL<sup>-1</sup> (curva 4); 25 μg mL<sup>-1</sup> (curva 5); 37.5 μg mL<sup>-1</sup> (curva 6) e 50 μg mL<sup>-1</sup> (curva 7). O deslocamento do ângulo de SPR (Δθ<sub>SPR</sub>) foi monitorado durante 30 minutos..... 64

**Figura 19:** Sensogramas referentes à associação do antígeno da Mb a partir de soluções de diferentes concentrações (100; 250 ; 500; 750 e 1000 μg.mL<sup>-1</sup>). .... 65

**Figura 20:** Sensogramas referentes à associação do anticorpo da Mb sobre os discos modificados com SAM MPA/MUA e PAMAM G5, a partir de soluções de diferentes concentrações (3,5; 12,5; 25; 37,5 e 50 μg mL<sup>-1</sup>). O deslocamento do ângulo de SPR (Δθ<sub>SPR</sub>) foi monitorado durante 30 minutos. .... 66

**Figura 21:** Sensogramas referentes ao imunoenensaio em sanduíche, mostrando a interação do sistema Ac/Ag/Ac com diferentes concentrações de Ag (0,001; 0,5; 0,8; 1 e 500 μg.mL<sup>-1</sup>). O deslocamento do ângulo de SPR (Δθ<sub>SPR</sub>) foi monitorado durante 30 minutos.....67

**Figura 22:** Sensograma referente ao imunoenensaio em sanduíche para a concentração de 0,001μg.mL<sup>-1</sup> de antígeno de mioglobina..... 68

**Figura 23:** Sensograma referente ao ensaio de regeneração da superfície do imunossensor empregando-se SDS 1.0%. .... 69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resumo de alguns biomarcadores cardíacos, destacando seus respectivos valores de massa molar, tempo de elevação clínica primária e tempo de pico.....	23
<b>Tabela 2:</b> Composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ) das soluções de plasma sanguíneo (PSG, pH 7,4) e urina (pH 6.0) sintéticas.....	53
<b>Tabela 3:</b> Valores da quantidade de carga (Q) associada com a redução de espécies na superfície e cobertura de superfície ( $\Gamma$ ) encontrados para eletrodo de ouro modificado por SAMs simples e mistas formadas por 3-MPA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 11-MUA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), após tempo de interação de 24 horas. ....	62
<b>Tabela 4:</b> Valores adicionados, encontrados e recuperados de Ag-Mb em amostras de plasma e urina artificiais. ....	69

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Doenças Cardiovasculares .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Diagnóstico Clínico do IAM .....	21
<b>2.3 Biomarcadores Cardíacos .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Mioglobina.....	24
<b>2.4 Métodos de detecção da mioglobina.....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Biossensores .....	26
2.4.1.1 Biossensores Catalíticos .....	26
2.4.1.2 Biossensores de Afinidade.....	27
2.4.1.2.1 Imunossensores.....	27
<b>2.5 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Imobilização de proteínas em superfícies sólidas .....</b>	<b>35</b>
2.6.1 Monocamadas Auto-organizadas (SAMs).....	35
2.6.1.1 Preparo, caracterização e propriedades das SAMs .....	36
2.6.1.2 Reações de ativação dos grupos terminações das SAMs .....	38
2.6.1.3 Composição das SAMs.....	40
<b>2.7 SPR e SAMs no desenvolvimento de imunossensores para detecção de marcadores cardíacos .....</b>	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Reagentes e soluções .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Limpeza da superfície de ouro .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Formação e caracterização das SAMs na superfície de Ouro .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Equipamentos utilizados nas medidas eletroquímicas e ópticas .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Construção do imunossensor .....</b>	<b>50</b>
4.5.1 Modificação dos substratos de SPR com SAMs mistas .....	50

4.5.2 Ativação dos grupos terminais das SAMs .....	50
4.5.3 Imobilização do anticorpo solúvel de Mb sobre o disco sensor modificado com as SAMs .....	50
4.5.4 Detecção direta do antígeno de Mb através do imunossensor em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1).....	51
4.5.5 Amplificação do sinal de SPR .....	51
4.5.6 Imobilização do anticorpo solúvel de Mb sobre o disco sensor modificado com SAM mista e PAMAM G5 .....	52
4.5.7 Imunoensaio em sanduíche.....	52
<b>4.6 Preparo das amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7 Detecção de antígenos de Mb nas amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina .</b>	<b>53</b>
<b>4.8 Regeneração da superfície sensora .....</b>	<b>54</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Construção e caracterização das monocamadas auto-organizadas (SAMs) em superfície de ouro.....</b>	<b>56</b>
5.1.1 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por Voltametria Cíclica (VC) .....	56
5.1.2 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	58
5.1.3 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por dessorção reductiva (DR).....	60
<b>5.2 Etapas de construção do imunossensor .....</b>	<b>62</b>
5.2.1 Imobilização de Anticorpos de Mb sobre o disco de ouro .....	62
5.2.2 Imobilização de Anticorpos de Mb sobre o disco de ouro com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) .....	63
5.2.3 Detecção direta do antígeno de Mb através do imunossensor em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1).....	64
5.2.4 Imobilização de anticorpos de Mb sobre o disco de ouro com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) e o PAMAM G5 .....	65
5.2.5 Detecção do antígeno de Mb através do Ensaio Sanduíche em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) e PAMAM G5.....	66
5.2.7 Regeneração da superfície sensora .....	69
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade prematura que atingem a população mundial. Estima-se que no ano de 2030 cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão de DCVs, principalmente proveniente de doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (WHO, 2011).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) está entre as DCVs que mais causam incapacidade e mortes na população global, resultando em alta taxa de mortalidade durante atendimentos de emergência. Portanto, é de fundamental importância um diagnóstico prévio para aumentar as chances de sobrevivência do paciente (QURESHI et al., 2012).

O diagnóstico do IAM é feito principalmente através de avaliação clínica dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente e do eletrocardiograma (ECG) seriado, que demonstra alterações em grande parte dos casos de IAM. Contudo, o uso de exames laboratoriais bioquímicos enzimáticos baseados em biomarcadores cardíacos, são altamente recomendados, concomitantemente aos exames clínicos e de imagem (GUPTA e SAKTHISWARRY, 2014).

Os marcadores cardíacos ou biomarcadores são macromoléculas intracelulares dos miócitos cardíacos, que incluem enzimas e proteínas contráteis. Quando há lesão do miocárdio, a perda da integridade da membrana dos miócitos permite a liberação dessas substâncias para a corrente sanguínea (HENRIQUES et al, 2006). Por isso, os marcadores bioquímicos são utilizados também como métodos de diagnóstico juntamente com os dados clínicos do paciente e o resultado do ECG (YANG e ZHOU, 2006).

Os testes laboratoriais mais utilizados atualmente para determinação de marcadores cardíacos possuem algumas limitações, incluindo o elevado consumo de reagentes, grande variação analítica no que diz respeito à sensibilidade e seletividade, elevado tempo de análise e elevado custo financeiro (HENRIQUES et al., 2006).

Neste sentido, os testes laboratoriais ainda são incompatíveis com a necessidade de decisões rápidas intrínsecas ao diagnóstico e tratamento de um paciente acometido de ataque cardíaco (ZHANG e NING, 2012). Desse modo, o desenvolvimento de biossensores explorando novas plataformas para detecção de biomoléculas apresenta-se como uma das mais promissoras formas de resolver alguns dos problemas referentes à sensibilidade, rapidez e custo nos diagnósticos.

Os biossensores são dispositivos utilizados para detectar e quantificar moléculas de interesse analítico e são amplamente utilizados como uma ferramenta analítica poderosa

em diagnósticos clínicos para a detecção de antígenos, anticorpos e ácidos nucleicos (MASCINI e TOMBELLI, 2008).

Nos últimos anos, dispositivos analíticos mais sofisticados para imunoenaios baseados em técnicas como Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR, do inglês, Surface Plasmon Resonance) têm sido recentemente explorados no monitoramento das interações entre antígenos e anticorpos (TANG et al., 2009; HOLMES et al., 2011).

O sistema de SPR funciona, basicamente, através de um fenômeno óptico-eletrônico em que um feixe de luz plano polarizada incide sobre uma superfície metálica, a um dado ângulo, capaz de excitar plásmons na superfície do metal. Concomitantemente à excitação dos plásmons de superfície é gerado um campo eletromagnético evanescente, que ao entrar em ressonância com a radiação incidente produz um ângulo de ressonância de plásmons de superfície ( $\theta_{SPR}$ ), o qual é sensível a alterações no índice de refração do meio (DAMOS et al., 2004). Assim, quando este índice é alterado pela imobilização de biomoléculas (como anticorpos e/ou antígenos), as condições de ressonância do sistema são alteradas e ocorre um desvio no  $\theta_{SPR}$ , que pode ser monitorado em função do tempo (HOLFORD et al., 2012).

Nesta perspectiva, é de fundamental importância a imobilização dessas biomoléculas para o desenvolvimento eficiente de biossensores. As biomoléculas imobilizadas devem manter a sua estrutura, função e atividades biológicas preservadas (OLIVEIRA et al., 2013). Uma das maneiras mais eficazes e estáveis de realizar a imobilização de proteínas reside na utilização de monocamadas auto-organizadas (SAMs, do inglês Self-Assembled Monolayers), que garantem maior preservação das propriedades dessas biomoléculas (LOVE et al., 2005).

Portanto, o desenvolvimento de novas plataformas que possam ser utilizadas na detecção de biomarcadores cardíacos abre perspectivas para avanços na área de diagnóstico do IAM de forma superior às técnicas convencionais empregadas no que diz respeito à possibilidade de detecção rápida e em tempo real. Dentre os diversos biomarcadores, a mioglobina (Mb) será o foco das abordagens do presente trabalho tendo em vista que a mesma apresenta baixo custo em comparação aos demais biomarcadores cardíacos, além de ser uma das primeiras proteínas liberadas pelo organismo quando o mesmo está sob efeito de IAM.

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas como causa principal de mortes em todo o mundo, contribuindo significativamente para o aumento dos custos com os cuidados na saúde (HOBBS et al., 2010).

Pesquisas realizadas por Murray e Lopez (1996), projetam para o ano de 2020 que a doença cardiovascular (DCV) permanecerá como causa principal de mortalidade e incapacitação, sendo que as regiões em desenvolvimento contribuem de forma mais marcante para o ônus da DCV do que as regiões desenvolvidas. Esse aumento das DCVs nas regiões em desenvolvimento resulta de três principais fatores:

- (i) redução da mortalidade por causas infecto parasitárias, o que contribui com aumento da expectativa de vida de forma a aumentar a probabilidade de que um indivíduo desenvolva DCVs;
- (ii) mudanças sócio-econômicas associadas à urbanização que possam contribuir para níveis mais elevados de fatores de risco para DCV e;
- (iii) suscetibilidade de determinadas populações a genes específicos que podem favorecer as DCVs (MURRAY e LOPEZ, 1996).

No Brasil, segundo informações do Ministério da Saúde, um fato que agrava o quadro das DCVs é que, aproximadamente, um terço dos óbitos por DCVs ocorrem precocemente em adultos na faixa etária de 35 a 64 anos. Nesta faixa etária, as principais causas de óbito por doenças do aparelho circulatório são as doenças isquêmicas do coração, as doenças cerebrovasculares e as doenças hipertensivas (ISHITANI et al., 2006).

Entre as doenças cardiovasculares, a de maior incidência é a doença arterial coronária (DAC) cujas principais manifestações clínicas são o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a morte súbita (BATLOUNI, 1993). Estratégias preventivas bem sucedidas exigem uma avaliação de risco para classificar os pacientes para a seleção de uma intervenção apropriada. O reconhecimento dos fatores de risco está no cerne dos esforços clínicos para diminuir o risco para DCVs (GRUNDY et al., 1999).

Segundo Prasad e colaboradores (2010), as DCVs estão relacionadas a uma série de fatores de risco, modificáveis e não modificáveis, dos quais alguns são conhecidos e outros desconhecidos. Dentre os fatores não modificáveis estão incluídos a idade, o sexo e o histórico familiar (BERENSON et al., 2015). Por outro lado, a maioria dos principais fatores

de risco para DCVs estão bem estabelecidos, sendo modificáveis e passíveis de intervenção, como a pressão arterial alta, colesterol elevado, obesidade, tabagismo, diabetes, má alimentação, ou inatividade física (HOBBS et al., 2010). Nos países desenvolvidos, pelo menos um terço de todas as DCVs é atribuído aos fatores de risco modificáveis (MACKAY e MENSAH, 2004).

Considerando que o IAM está entre as principais DCVs que mais causam mortes no mundo (TANG et al., 2007), nesta revisão será abordada com maior ênfase as causas, consequências e diagnósticos dessa patologia.

## **2.2 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)**

O infarto agudo do miocárdio (IAM) representa uma das causas mais comuns de mortes em atendimentos de emergências, sendo causado pela necrose aguda do tecido do miocárdio, devido ao quadro de grave isquemia, levando a altos índices de morbidade e mortalidade no mundo (QIAN et al., 2009). Estimativas apontam que, cerca de três a quatro milhões de pessoas no mundo, podem sofrer de IAM a cada ano (White e Chew, 2008). Apesar da melhoria de opções terapêuticas, a taxa de sobrevivência para pacientes afetados manteve-se praticamente constante, com uma população crescente de pacientes com IAM (KIHARA, 2011).

Diante dessa problemática, uma alternativa seria o tratamento precoce de problemas no miocárdio, que pode contribuir significativamente para prevenir o infarto agudo do miocárdio (IAM) e evitar danos irreversíveis ao coração. No entanto, essas intervenções exigem um diagnóstico precoce e preciso dessa patologia (KAKOTI e GOSWAMI, 2013; JACROUX et al., 2014).

### **2.2.1 Diagnóstico Clínico do IAM**

O paciente com suspeita de IAM primeiramente tem seus sinais e sintomas avaliados no exame clínico, sendo os mais frequentes a elevação da pressão arterial, a presença de dor no peito ou em alguns casos no membro superior esquerdo, suor frio, falta de ar, palpitações, náuseas ou vômitos (JARROS e ZANUSSO Jr, 2014). O método mais usado é o eletrocardiograma seriado, que demonstra alterações na maior parte dos casos de IAM. Ainda podem ser realizados exames como: raio-X de tórax, ressonância magnética, imagem nuclear e tomografia computadorizada (GUPTA e SAKTHISWARRY, 2014).

O eletrocardiograma (ECG) é um método muito usado para medir e diagnosticar ritmos anormais do coração e ajuda a diagnosticar danos ao tecido condutor que transporta sinais elétricos. No entanto, o ECG apresenta algumas limitações, dentre elas, a sua realização repetidas vezes para monitorar as alterações da condição clínica do paciente (LEISY et al., 2013). Além disso, o exame eletrocardiográfico apresenta certa limitação no diagnóstico do IAM, pois muitos pacientes com dor torácica apresentam-se com padrões normais ou inconclusivos, e somente 15% a 17% têm resultados definidos a tempo de o miocárdio ser salvo (BRUSH et al., 1985).

Assim, para superar as limitações e problemas com ECG, uma alternativa seria o uso de potenciais biomarcadores cardíacos, aplicados para fins de detecção.

### **2.3 Biomarcadores Cardíacos**

Os biomarcadores cardíacos são proteínas liberadas na circulação sanguínea pelo músculo cardíaco danificado. Por isso, além da confirmação do diagnóstico, as dosagens dos marcadores cardíacos também são de fundamental importância para o tratamento precoce adequado ao paciente, para o acompanhamento da evolução do quadro desse paciente, bem como redução de internações desnecessárias (MOLLER, 2005).

Uma desvantagem no emprego de marcadores cardíacos é que não existe um marcador ideal. Para chegar à idealidade, o marcador teria que apresentar características, incluindo alta sensibilidade e especificidade clínica, liberação rápida para o diagnóstico precoce, capacidade de permanecer elevado por um período de tempo razoável, permitindo uma janela de diagnóstico adequado, e a capacidade de ser analisado quantitativamente com baixo custo e eficiência de tempo. Desta forma, são necessários vários marcadores para atender estes requisitos (YANG e ZHOU, 2006).

Várias proteínas como aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacilítica (AST/TGO), creatina quinase (CK-Total), isoenzimas de CK e desidrogenase do lactato (LDH) têm sido utilizadas como marcadores cardíacos. Porém, estas proteínas não são produzidas especificamente pelo coração, sendo encontradas em outros tecidos de forma que seus níveis sanguíneos podem estar elevados em outras condições patológicas não cardíacas. A procura de testes mais rápidos e específicos levou ao desenvolvimento de pesquisas baseadas em proteínas como a Creatina fosfoquinase fração MB (CK-MB), Proteína C-reativa (PCR), Mioglobina (Mb) e Troponinas (cTnT e cTnI) (ALDOUS, 2013). Estes e outros

biomarcadores cardíacos emergiram como preditores de riscos para as doenças cardíacas, conforme listado na tabela 1, a seguir.

**Tabela 1:** Resumo de alguns biomarcadores cardíacos, destacando seus respectivos valores de massa molar, tempo de elevação clínica primária e tempo de pico.

ND: não definido

<b>Biomarcador Cardíaco</b>	<b>DCV</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Massa Molar (kDa)</b>	<b>Elevação inicial</b>	<b>Tempo até o pico</b>	<b>Volta nível normal</b>
<b>Troponina I (cTnI)</b>	Detecção de IAM	Alta	23,5	4-6 horas	12-24 horas	6-8 dias
<b>Troponina T (cTnT)</b>	Detecção de IAM	Alta	37	4-6 horas	12-24 horas	7-10 dias
<b>Mioglobina</b>	Detecção precoce de IAM	Baixa	17,8	1-3 horas	6-12 horas	24-48 horas
<b>Proteína C-reativa</b>	Detecção precoce de inflamação cardíaca	Alta	125	ND	ND	ND
<b>Creatina quinase MB (CK-MB)</b>	Detecção precoce do IAM	Média	85	4-6 horas	12-24 horas	3-4 dias
<b>Fator de necrose tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Detecção de inflamação / fator de risco cardíaco	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Interleucina-6 (IL-6)</b>	Detecção de inflamação / fator de risco cardíaco	ND	ND	ND	ND	ND

Fonte: Adaptado de (McDONNELL et al., 2010; DELLAS et al., 2010 e QURESHI et al., 2012)

Dentre os biomarcadores mencionados, destaca-se a mioglobina, que, embora não seja um marcador específico, devido à sua presença abundante não só no miocárdio, mas também nas células do músculo esquelético, é o primeiro marcador liberado depois da ocorrência de dano às células musculares do miocárdio (QURESHI et al, 2012; (YANG e ZHOU, 2006). Por ser uma molécula pequena e de rápida liberação após o início dos sintomas de IAM, a mesma apresenta boa sensibilidade e alto valor preditivo negativo, fazendo da mioglobina um valioso marcador de identificação precoce do IAM (BROGAN JR, et al., 1994). Assim, esse marcador será foco no desenvolvimento do presente trabalho.

### 2.3.1 Mioglobina

A mioglobina é uma proteína globular, com baixo peso molecular (17,8 kDa), que possui um grupo prostético heme. É encontrada em todas as fibras musculares estriadas, sendo responsável por cerca de 2% da massa dos músculos esquelético e cardíaco. Foi a primeira proteína não enzimática utilizada no diagnóstico do IAM e cuja descoberta foi feita na década de 1970 (SILVA e MORESCO, 2011). Seu pequeno peso molecular permite que ela seja liberada rapidamente na corrente sanguínea, tanto após uma lesão do músculo esquelético quanto na necrose cardíaca (ADAMS, 1999; SINGH et al., 2010). Assim, é um marcador sensível, mas não específico de IAM, necessitando da exclusão de lesão do músculo esquelético (CAIRNS et al, 1983; THIELMANN et al., 2004).

Esta proteína é liberada na corrente sanguínea quando as células musculares estão danificadas tal que sua concentração no soro é elevada acima do valor normal cerca de 1 a 3 horas após a morte de células do músculo cardíaco e está também relacionada com o grau de lesão do miocárdio (CHRISTENSON e AZZAZY, 1998). Pode ser detectada em fluidos biológicos tais como sangue e urina. Os níveis normais de mioglobina em soro humano variam, aproximadamente, de 6 ng.mL<sup>-1</sup> a 85 ng.mL<sup>-1</sup> (DE WINTER et al., 1996). As concentrações de corte da mioglobina em casos de IAM podem variar na faixa de 70 a 100 ng.mL<sup>-1</sup> (LIAO et al., 2009; DE WINTER et al., 1996; LAPERCHE et al., 1995; MATHEW et al., 1999 ) ou de 100 a 250 ng.mL<sup>-1</sup> (SUPRUN et al.,2011; NEWBY et al., 2001; DI SERIO et al., 2003), dependendo da condição individual do paciente. Os níveis máximos de Mb em casos de IAM são variáveis com concentrações variando de 420 a 600 ng mL<sup>-1</sup>, (STONE, et al., 1977). Depois de 4 a 50 horas de um episódio de IAM, a Mb pode também ser excretada na urina (DONALD et al., 1977) . Estes níveis são também bastante variáveis, podendo chegar a 3000 µg.mL<sup>-1</sup>, em casos mais graves de IAM (CLOONAN et al., 1979; POWELL, et

al., 1984).

As moléculas de mioglobina são liberadas no sangue dentro de 1 hora, enquanto as troponinas e CK-MB são liberadas após 3 e 6 horas, respectivamente (CHRISTENSON e AZZAZY, 1998). Os níveis de mioglobina podem aumentar para cerca de  $250 \text{ ng.mL}^{-1}$  num intervalo de tempo de 90 minutos em casos de IAM, enquanto os níveis de CK-MB e troponinas ainda permanecem inalterados (SALLACH et al., 2004). Assim, a mioglobina possui alta sensibilidade e é o biomarcador de IAM mais precoce quando comparado com as troponinas e CK-MB (KILPATRICK et al., 1993; FRIESS e STARK, 2009; CHRISTENSON e AZZAZY, 2009).

Por apresentarem valores clínicos de detecção significativamente baixos, os métodos de ensaio para determinação desta proteína precisam ser altamente sensíveis (GNEDENKO et al., 2013). Neste sentido, são abordados a seguir alguns métodos utilizados para detectar a mioglobina.

## **2.4 Métodos de detecção da mioglobina**

As técnicas atuais de diagnóstico de mioglobina, tais como radioimunoensaio, imunoensaio quimioluminescente, e ensaios imunoenzimáticos, apresentam alta sensibilidade e seletividade; no entanto, são processos de vários estágios, demorados e com dispendioso uso de reagentes. O imunoensaio de fluorescência é um poderoso método que tem sido muito utilizado para a detecção de biomarcadores de IAM, mas envolve o uso de marcadores fluorescentes tornando-o complicado e demorado (SHARMA et al., 2010).

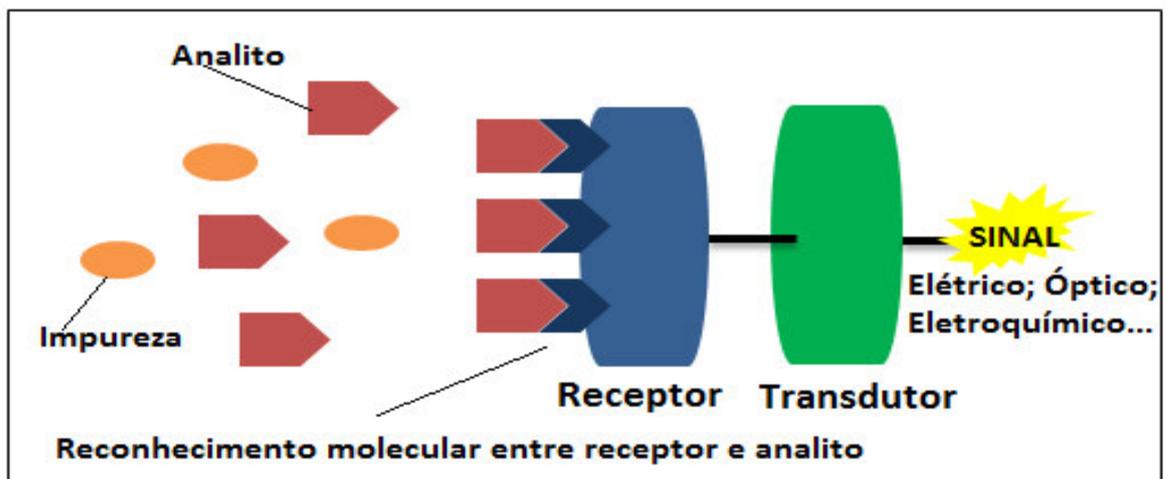
O método mais empregado atualmente consiste na determinação sérica da mioglobina realizado através de técnicas imunológicas, como o Teste de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático) (MULLER-BARDORFF et al., 1997). No entanto, Waard e van't Sant (2009) destacaram limitações neste tipo de procedimento incluindo a instabilidade, imprecisão e limite de detecção limitado (aproximadamente  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para este teste.

Portanto, o desenvolvimento de um método de detecção rápido e preciso para biomarcadores, livre de marcadores químicos é urgentemente necessário para reduzir o tempo de diagnóstico, diminuir o custo do tratamento e salvar a vida dos pacientes (QIAN et al., 2009). Nesta perspectiva, o uso de biossensores pode ajudar no diagnóstico rápido e reduzir o tempo de espera para divulgação de resultados.

### 2.4.1 Biossensores

Um biossensor é definido como um dispositivo analítico que combina a alta especificidade e sensibilidade de um elemento biológico (receptor) intimamente associado ou integrado a um transdutor de sinal. A ligação do analito ao receptor produz uma perturbação na interface transdutor/meio analisado resultando na variação do sinal captado pelo transdutor (ZHAI et al., 1997; GERARD e CHAUBEY, 2002) como apresentado na figura 1.

**Figura 1:** Esquema geral de funcionamento de um biossensor.



Fonte: Próprio autor.

Fundamentalmente, os biossensores podem ser classificados em função: do tipo de interação (entre o elemento de reconhecimento e o analito); do método utilizado para detectar esta interação; da natureza dos elementos de reconhecimento; e o tipo de sistema de transdução (RUMAYOR et al., 2005). Para Rasooly (2005), a classificação dos biossensores quanto à natureza do elemento de reconhecimento compreende dois grandes grupos: biossensores de afinidade (bioafinidade) e biossensores catalíticos (biocatalítico). E quanto ao princípio de transdução podem ser ópticos, acústicos, eletroquímicos, piezoelétricos, etc (RUMAYOR et al., 2005). Neste sentido, a seguir são abordados de forma geral os biossensores catalíticos e biossensores de afinidade com princípio de transdução óptica.

#### 2.4.1.1 Biossensores Catalíticos

Segundo Clark e colaboradores (1962), os biossensores biocatalíticos foram os primeiros a serem desenvolvidos e podem ser utilizados na presença de um ou mais analitos.

Dentre os elementos de reconhecimento empregados em biossensores catalíticos destacam-se as enzimas. A natureza catalítica desses biossensores permite a detecção de substratos, produtos e inibidores de reações enzimáticas com elevada sensibilidade (RASOOLY, 2005).

#### 2.4.1.2 Biossensores de Afinidade

Os biossensores de afinidade funcionam baseados na interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o elemento em análise. Dessa maneira, o equilíbrio é alcançado sem o consumo da amostra pela molécula de captura. A interação antígeno-anticorpo é o melhor exemplo desse tipo de biossensor (RASOOLY, 2005).

O elemento de reconhecimento interage com o analito a ser detectado e, desta forma, ocorre uma alteração de alguma propriedade físico-química interfacial, como a massa, índice de refração, absorvância, potencial de redução, etc. Entre os elementos de reconhecimento disponíveis, os anticorpos são os mais utilizados devido à excelente seletividade e sensibilidade (LUPPA et al., 2001; LIN e JU, 2005).

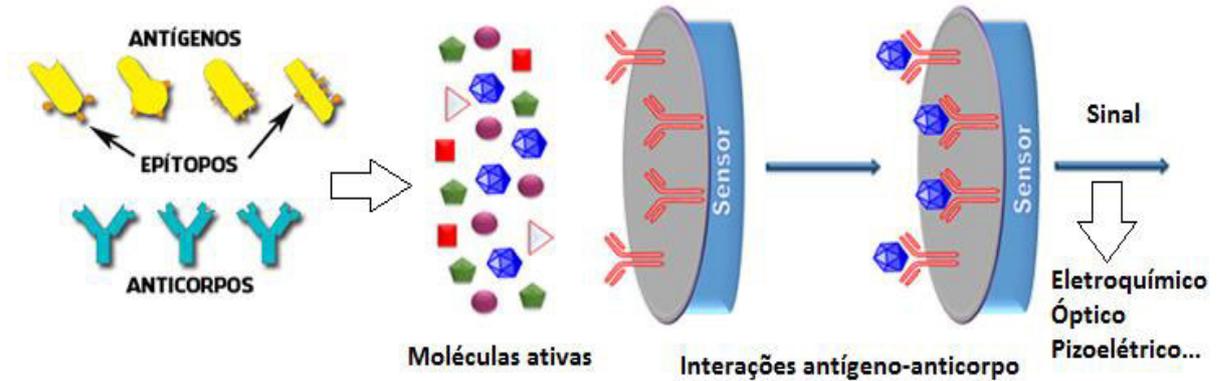
Na interação imunológica, o anticorpo interage com uma única molécula ou um grupo limitado de moléculas (antígenos), através de seus epítomos (sítios de ligação específicos), formando um complexo estável (RICCARDI et al., 2002).

A interação Ag/Ac pode ser monitorada por diversas técnicas, dentre elas o teste ELISA é o mais utilizado em análises clínicas e biológicas. No entanto, os ensaios baseados neste teste apresenta algumas limitações como instabilidade, imprecisão e limite de detecção limitado (WAARD E VAN'T SANT, 2009). Por outro lado, as estratégias utilizadas em ELISA são bastante úteis no desenvolvimento de imunossensores (D'ORAZIO, 2003; RUSLING et al., 2010).

##### 2.4.1.2.1 Imunossensores

Os imunossensores constituem uma classe de biossensores baseados na afinidade antígeno-anticorpo, cuja reação imunoquímica é detectada e o sinal medido por um transdutor (LUPPA et al., 2001), conforme ilustrado na figura 2.

**Figura 2:** Esquema de funcionamento de um imunossensor, bem como as estruturas representativas de anticorpos e antígenos com seus respectivos epítopos, responsáveis pelas reações de afinidade.



Fonte: Adaptado de <http://www.biomedicinabrasil.com/interacoes-antigeno-anticorpo>.

Os imunossensores combinam a inerente especificidade das imunorreações com a sensibilidade dos transdutores, além de apresentar rapidez de análise e a possibilidade de serem portáteis. (LUPPA et al., 2001; LIN e JU, 2005). Assim, dentre as vantagens dos imunossensores frente ao ELISA está a possibilidade de uso em análise remota, além do menor consumo de amostra, menor tempo de análise e possibilidade de automação (RUSLING et al., 2010).

A maioria dos imunossensores desenvolvidos é baseada em ensaios do tipo competitivo (direto ou indireto) ou sanduíche. Nesses dois ensaios é feita a marcação do Ac ou Ag com uma enzima redox, e a formação do complexo é monitorada pelo produto da reação da enzima com o substrato. Porém, em alguns ensaios a formação do complexo é detectada de forma direta não competitiva. Nessa abordagem a simples ligação entre o antígeno e o anticorpo é suficiente para detectá-la e quantificá-la (RICCARDI et al., 2002).

Para ensaios do tipo direto, a microbalança de cristal de quartzo (QMC), a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a ressonância de plásmons de superfície (SPR) são as técnicas mais comuns utilizadas para a detecção, sem marcação, do imunocomplexo. Similarmente, para ensaios competitivos e sanduíche, a marcação não é usada para medições em SPR e QCM (RICCI et al., 2007).

Nesta perspectiva, os imunossensores ópticos estão diretamente associados às mudanças de propriedades ópticas das substâncias tais como absorção de radiação, fluorescência, fosforescência, refletância, índice de refração, comprimento de onda, entre outros. Dentre os sistemas ópticos de transdução destaca-se a técnica de SPR, uma vez que se trata de um sistema de transdução extremamente sensível (MOREIRA et al., 2008).

Os imunossensores que utilizam a técnica SPR para transdução óptica permitem o monitoramento em tempo real de alterações no índice de refração na interface de um dielétrico coberto com uma superfície metálica (MOREIRA et al., 2008). A seguir, é feita uma superficial abordagem da ressonância de plásmons de superfície.

## **2.5 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)**

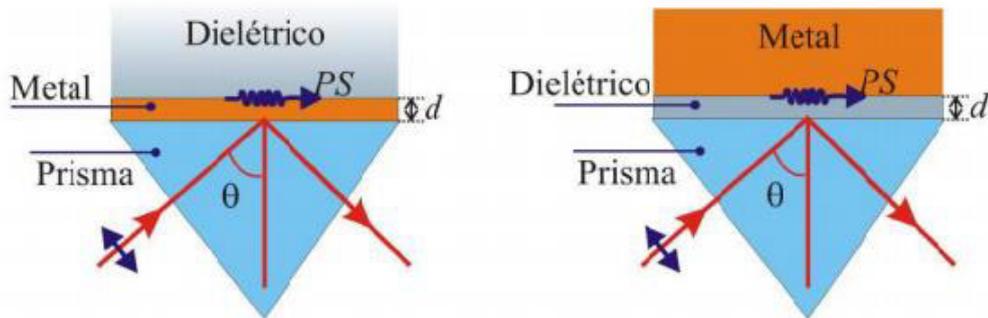
A técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície tem despertado grande interesse em inúmeras áreas incluindo o estudo de interações biomoleculares e bioespecíficas devido à possibilidade de caracterização em tempo real de interações entre biomoléculas. Esta técnica também tem sido bastante aplicada na caracterização de monocamadas e bicamadas orgânicas automontadas. Neste sentido, diversos autores tem demonstrado que a técnica de SPR é eficiente na estimativa de constantes de velocidade e de equilíbrio envolvidas nas etapas de associação e dissociação de biomoléculas bem como na estimativa da espessura de filmes finos. (THILLAIVINAYAGALINGAM et al., 2009; HOMOLA et al., 1999; CARVALHO et al., 2003; SZABO et al., 1995; GREEN et al., 1997).

A ressonância de plásmons de superfície baseia-se nas propriedades ópticas e é recorrentemente aplicada em estudos de fenômenos de superfície mediante o monitoramento do índice de refração devido, por exemplo, a ligação de uma molécula à superfície do metal. O efeito da ressonância plasmônica é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e o outro, um dielétrico (CARVALHO et al., 2003).

Os primeiros trabalhos que utilizaram esta técnica foram realizados em 1902, pelo físico Wood, que observou estreitas faixas escuras no espectro de luz difratada numa superfície metálica. Estas faixas foram denominadas de irregularidades e estavam associadas à excitação de ondas eletromagnéticas na superfície metálica (HOMOLA, 2006).

Posteriormente, na década de 60, Otto e Kretschmann tornaram-se pioneiros na investigação da técnica de SPR. Estes verificaram que quando um feixe de luz monocromática incide sobre uma superfície metálica, com capacidade de reflexão interna total, ocorre uma diminuição da intensidade de luz refletida (HOMOLA et al., 1999; CARVALHO et al., 2003), conforme esquematizado na figura 3.

**Figura 3:** Configurações de Kretschmann (à esquerda) e de Otto (à direita) utilizando o método de reflexão total.



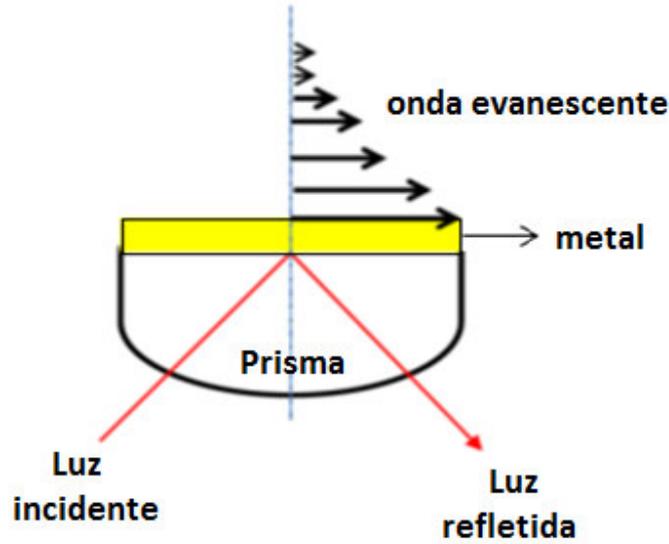
Fonte: Adaptado de Cavalcanti, 2013.

Estas configurações podem ser usadas para excitação dos plasmões de superfície (PS), originando as ondas de plásmons de superfície bem como ondas evanescentes. Na configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal. Na configuração de Kretschman, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa. A maioria dos equipamentos de SPR, comerciais ou construídos em laboratório, utiliza a configuração de Kretschmann, pois geralmente apresentam maior sensibilidade e resolução em relação aos dispositivos que operam por grades de difração (HOMOLA, 2006; CARVALHO, 2003).

A configuração de Kretschmann baseia-se no fenômeno de reflexão interna total, isto é, quando um feixe de luz se propaga de um meio com elevado índice de refração para um meio com baixo índice de refração há grande supressão na refração da radiação se o ângulo de incidência for maior que um determinado ângulo designado como ângulo crítico ( $\theta_c$ ). Deste modo, o feixe de luz é totalmente refletido, no meio original, designando-se assim por reflexão interna total (HOMOLA, 2006).

Quando um feixe luminoso incide numa interface entre os meios indicados na figura 4 (ou seja, prisma, metal e meio dielétrico), acima do ângulo de reflexão total, ocorre a formação de uma oscilação de densidade de carga superficial devido à excitação dos elétrons livres presentes na superfície metálica tal que uma grande quantidade da energia da radiação incidente é transferida por ressonância para a oscilação de superfície. Este comportamento origina uma onda eletromagnética denominada onda evanescente, cujo vetor do campo elétrico é máximo na superfície e decai exponencialmente com a distância da interface metal/dielétrico (HOMOLA, 2006).

**Figura 4:** Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica.



Fonte: Adaptado de Oliveira, 2013.

A ressonância de plasmóns de superfície ocorre quando num determinado ângulo de incidência a componente paralela do fóton de luz incidente ( $k_x$ ) coincide com o vetor de onda correspondente à dispersão dos elétrons presentes numa dada interface metal-meio dielétrico ( $k_{SPR}$ ) (Equações 1.a e 1.b). Sob tais condições de acoplamento observa-se uma diminuição abrupta na refletância devido à formação da onda evanescente, a qual se propaga através da superfície metálica e interage com o meio externo (equação 1.c).

$$k_x = (\omega/c)\sqrt{\varepsilon_p} \text{sen}(\theta) \quad (1.a)$$

$$k_{OPS} = (\omega/c) \sqrt{\frac{(\varepsilon_p \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + \varepsilon_m)}} \quad (1.b)$$

$$(\omega/c)\sqrt{\varepsilon_p} \text{sen}(\theta) = (\omega/c) \sqrt{\frac{(\varepsilon_p \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + \varepsilon_m)}} \quad (1.c)$$

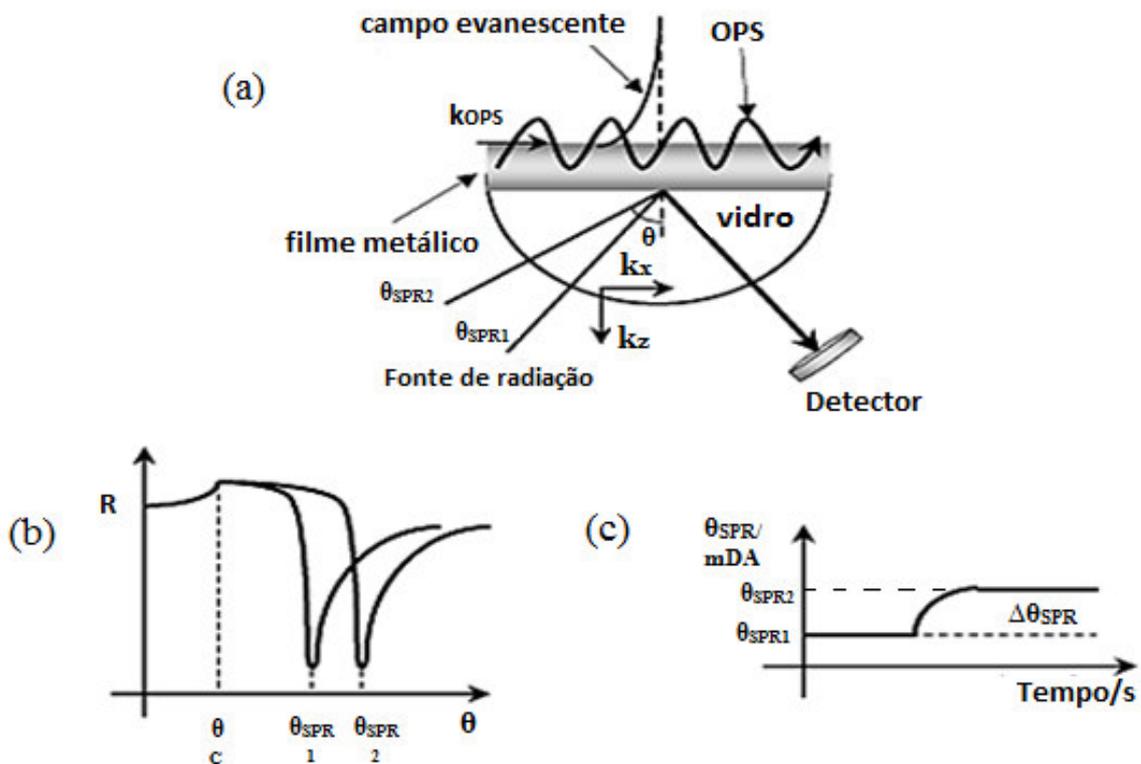
onde  $\theta$  é o ângulo de incidência da luz com a superfície do metal,  $\varepsilon_p$  é a constante dielétrica do prisma,  $\varepsilon_m$  é a constante dielétrica do meio ambiente em contato com o filme de ouro,  $\omega$  é a frequência angular da luz incidente e  $c$  a velocidade da luz no vácuo.

Desta forma, as alterações nas proximidades da interface metal/dielétrico promovem uma alteração nas condições de ressonância do sistema e como resultado ocorre um deslocamento no  $\theta_{SPR}$  (figuras 5 (a) e 5 (b)) (Equação 2).

$$\arcsen(\theta) = \sqrt{\frac{(\epsilon_p \epsilon_m)}{\epsilon_p (\epsilon_p + \epsilon_m)}} \quad (2)$$

Nesta última equação pode-se verificar que as propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e do meio, provocam mudanças no ângulo de ressonância, tornando possível explorar o fenômeno de SPR como medida de alterações na superfície do sensor mediante um acompanhamento do ângulo de ressonância com o tempo (figura 5 (c)). A posição do ângulo em que ocorre o máximo de ressonância depende do índice de refração do meio em que está em contato com o metal, e varia proporcionalmente com a concentração das moléculas presentes na solução, pois, uma alteração na concentração provoca uma alteração no índice de refração.

**Figura 5:** a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência de energia da onda incidente para a onda evanescente (OPS); (b) Curvas de refletância na ausência ( $\theta_{SPR1}$ ) e presença ( $\theta_{SPR2}$ ) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o  $\theta_{SPR}$  (dado em mDA - miligráus de ângulo) e o tempo.

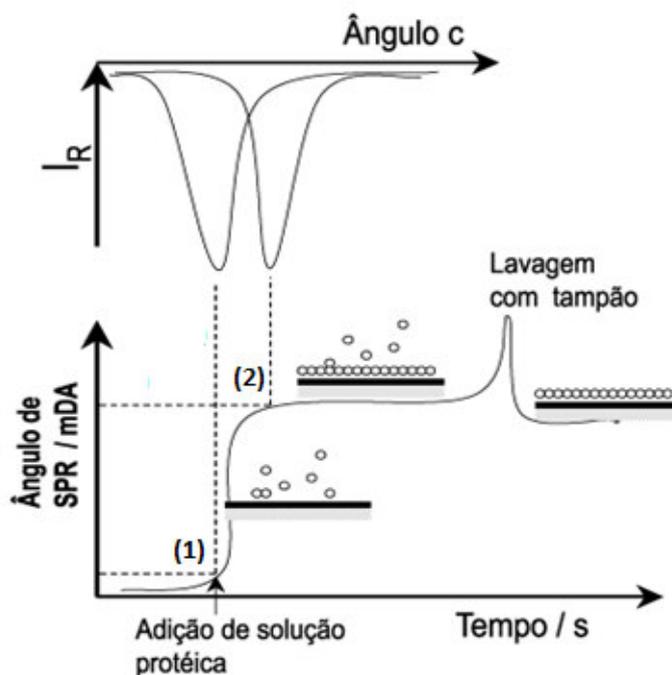


Fonte: Adaptado de Damos et al., 2004.

Assim, mudanças no índice de refração nas proximidades da superfície do sensor permitem a aplicação da técnica de SPR para obter informações em tempo real e sem a necessidade de marcadores biológicos e/ou químicos sobre velocidade e extensão da adsorção, determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação, bem como constantes de afinidades em interações específicas (GREEN et al., 1997; SZABO et al., 1995).

A figura 6 apresenta um sensograma típico de SPR obtido durante a interação de um analito com a superfície metálica. Inicialmente, a superfície é exposta a uma solução adequada para gerar uma linha de base (figura 6 - (linha 1)). A partir do instante que o analito entra em contato com a superfície de forma que ocorra uma interação analito-superfície há um deslocamento no ângulo SPR. Nesta etapa, o ângulo de SPR pode atingir um patamar devido à saturação da superfície com o analito e/ou devido ao estabelecimento do equilíbrio. Por último, a solução de amostra é removida na lavagem com a solução adequada de forma a se remover as espécies ligadas inespecificamente resultando em uma segunda linha de base (figura 6 - (linha 2)). A diferença entre a linha de base (1) e (2) fornece uma indicação sobre a extensão da adsorção (CARVALHO et al., 2003; THILLAIVINAYAGALINGAM et al., 2009).

**Figura 6:** Esquema de um sensograma de SPR para a adsorção de uma proteína numa superfície metálica. A mudança no valor do ângulo de SPR em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção. Onde IR – intensidade da radiação refletida e mDA – miligráus de ângulo.



Desta forma, a técnica SPR é bastante aplicada como sistema de transdução em biossensores. Como sistema de transdução em imunossensores a técnica de SPR destaca-se em investigações de modelos de processos de reconhecimento molecular, nomeadamente, no monitoramento de interações proteína-proteína, ou proteína-ligante em tempo real permitindo ainda a quantificação das espécies. Neste sentido, a técnica de SPR apresenta um grande potencial para o desenvolvimento e preparação de biossensores de afinidade, permitindo análise em tempo real de interações bio-específicas sem uso de marcadores (CARVALHO et al., 2003; SZABO et al., 1995; GREEN et al., 1997).

A possibilidade de análises de eventos em superfícies e interfaces na proximidade de finos filmes metálicos faz com a técnica de SPR seja útil em diversas investigações, tal como na obtenção de parâmetros acerca da especificidade, afinidade e cinética de interações biomoleculares, bem como sobre as concentrações de analitos, como, por exemplo, antígenos ou anticorpos presentes em matrizes complexas (HOA et al., 2007; HOMOLA, 2006; SHANKARAN et al., 2007). Em conjunto ou isoladas, essas informações podem ser diretamente aplicadas na engenharia molecular (KIM et al., 2005), análises de alimentos (WU et al., 2013), monitoramento ambiental (WANG et al., 2007), bacteriologia (ZHANG et al., 2006), virologia (RICH e MYSZKA, 2003), biologia celular (OLI et al., 2006), desenvolvimento de drogas (CIMITAN et al., 2005) e diagnóstico clínico laboratorial (LIU et al., 2011; SOUTO et al., 2013).

Na esfera do diagnóstico laboratorial, o desenvolvimento de imunossensores se apresenta como a principal aplicação da técnica, uma vez o sinal de SPR gerado é proporcional à concentração de antígenos ou anticorpos presentes em um espécime clínico, o que possibilita a realização de determinações qualitativas e semi quantitativas (HOLFORD et al., 2012). Os dispositivos obtidos a partir da SPR são bastante simples, rápidos, específicos, reutilizáveis e hábeis na detecção de analitos em níveis abaixo do nanomolar (SHANKARAN et al., 2007; VAISOCHEROVA et al., 2007). Além disso, a instrumentação utilizada em SPR é passível de miniaturização, o que permite o desenvolvimento de sistemas portáteis para aplicação *in situ* (SOELBERG et al., 2005; PREECHABURANA et al., 2012).

## 2.6 Imobilização de proteínas em superfícies sólidas

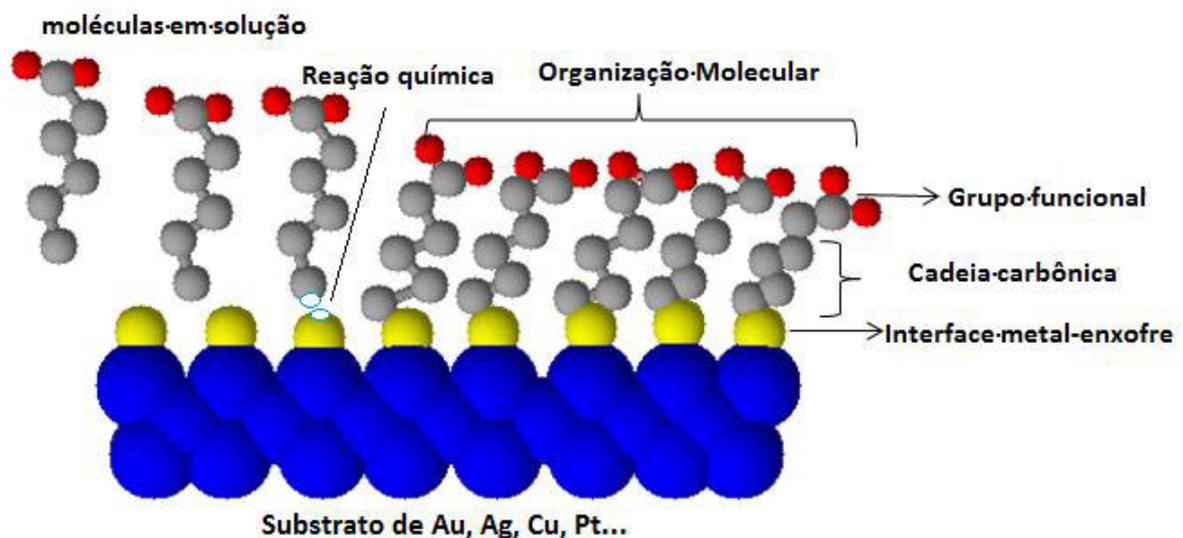
A imobilização de biomoléculas é uma etapa chave no desenvolvimento eficiente de biossensores. As biomoléculas imobilizadas devem manter a sua estrutura, função e atividade biológica. O tipo de imobilização afeta a atividade e estabilidade das biomoléculas. Fatores como a precisão e a repetibilidade das medidas são fortemente influenciadas pela estabilidade da biomolécula imobilizada (OLIVEIRA et al., 2013).

Uma das maneiras mais eficazes e estáveis de realizar a imobilização de proteínas reside na formação de ligações covalentes entre monocamadas auto-organizadas (SAMs) e as biomoléculas (LOVE et al., 2005).

### 2.6.1 Monocamadas Auto-organizadas (SAMs)

As monocamadas auto-organizadas (SAMs do inglês Self-Assembled Monolayers) de tióis são “organizados” moleculares onde as moléculas compartilham uma orientação comum devido à afinidade do átomo de enxofre (grupo cabeça) destas moléculas por determinados substratos. Em tais sistemas, o grupo cabeça corresponde a um átomo de enxofre (que possui elevada afinidade por determinados substratos metálicos) e o “corpo” corresponde a uma cadeia orgânica (DUBOIS e NUZZO, 1992), conforme pode ser observado na figura 7.

**Figura 7:** Representação esquemática da formação de uma monocamada a partir de uma solução de alcanotióis.



Fonte: Próprio autor

A auto-organização nestes sistemas está intimamente relacionada com a afinidade do “grupo cabeça” das moléculas pelo substrato e associado à interação favorável entre os grupos que constituem o “corpo” da molécula. Como resultado, estes sistemas podem formar filmes finos (dimensões nanométricas e sub-nanométricas) que tem possibilitado um amplo controle de propriedades físico-químicas das mais variadas superfícies metálicas (ULMAN, 1996).

Um dos aspectos importantes destes organizados moleculares é sua elevada versatilidade em termos do controle de suas propriedades interfaciais podendo funcionar como barreira eletrostática ou física assim como, contrariamente, funcionando como promotores de reações químicas mediante o controle do grupo terminal das moléculas constituintes. Neste sentido, um grande número de SAMs fundamentadas nos mais variados tipos de tióis, visando as mais variadas aplicações, tem sido desenvolvidas (WHITESIDES e LAIBINIS, 1990).

#### 2.6.1.1 Preparo, caracterização e propriedades das SAMs

Considerando os aspectos estruturais moleculares dos alcanotióis empregados como unidades para a construção destas nanoestruturas, em geral, o preparo das SAMs envolve o simples contato das unidades com o substrato pelo qual estas apresentam afinidade (DAMOS et al., 2005). Contudo, em termos experimentais, o preparo de monocamadas auto-organizadas de tióis apresenta um protocolo extremamente dependente de inúmeras variáveis como: tipo de substrato (natureza, morfologia, etc...), procedimento de limpeza do substrato (métodos químicos, eletroquímicos, térmicos, etc), tipo de solvente empregado, concentração, tempo e temperatura da solução de deposição, entre outras (LOVE et al., 2005).

Um grande número de substratos, bem como variados tipos de moléculas, são empregados para confecção de sistemas auto-organizados, incluindo metais como ouro (THOUGHTON et al., 1998; VERCELLI et al., 2006), prata (DOUBOVA, 2010), platina (VERCELLI et al., 2006; ROSARIO-CASTRO et al., 2006), paládio (STAPLETON et al., 2005), níquel, cobre (SHIH, et al., 2008), óxidos (OSAKA e YOSHINO, 2007), entre outros.

Dentre os substratos, destaca-se o ouro, que desperta elevado interesse devido sua elevada versatilidade quando se trata de sua aplicação, podendo ser empregado como matriz numa gama de técnicas para caracterização de SAMs (técnicas eletroquímicas, acústicas e ópticas) possibilitando assim o uso combinado das mesmas visando uma melhor caracterização destas nanoestruturas. Além disto, o uso do ouro como substrato tem permitido

que problemas comuns em SAMs sobre outros metais como cobre e prata, que tendem a formar camadas de óxido, sejam evitados minimizando problemas associados à reprodutibilidade do processo de auto-organização (LOVE et al., 2005). Por fim, com grande importância aparece a grande afinidade que estes substratos apresentam por alcanotióis -  $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ , o que facilita enormemente o processo de confecção destas nanoestruturas resultando em estruturas estáveis por dias ou até mesmo meses (SCHREIBER, 2000; FREIRE et al., 2003; ARYA et al., 2009).

O protocolo mais comum para o preparo de monocamadas auto-organizadas sobre ouro consiste na imersão do substrato limpo em solução etanólica diluída do tiol ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a  $10 \text{mmol.L}^{-1}$ ) por um período de 2 a 48 horas, à temperatura ambiente. Como consenso entre os grupos de pesquisa na área, o estágio inicial do processo de confecção das SAMs consiste na adsorção rápida do adsorbato sobre o substrato (de alguns milisegundos a poucos minutos), seguindo-se por um processo lento de re-organização molecular que requer tempos da ordem de horas minimizando os defeitos e vazios na SAM bem como maximizando a densidade de moléculas na superfície do substrato (PETERLINZ e GEORGIADIS, 1996).

Embora, fundamentalmente importante, o gradiente de concentração não exprime toda a relevância da cinética do processo de adsorção e os efeitos do tipo de solvente empregado na confecção das SAMs tem se apresentado como fator igualmente importante já que a escolha inadequada do solvente pode aumentar em várias ordens de magnitude o tempo de confecção das SAMs (LOVE et al., 2005). Embora o etanol tenha sido largamente empregado como solvente para confecção de SAMs devido sua disponibilidade com elevada pureza e pequena toxicidade, outros solventes como tetrahidrofurano, dimetilformamida, ciclo-octano, tolueno, entre outros têm sido empregados (LOVE et al., 2005; DAMOS et al., 2005). Uma importante consequência da escolha correta do solvente para um determinado processo de confecção de SAMs é a influência do mesmo na qualidade das monocamadas confeccionadas (arranjo conformacional molecular, regiões com ausência de adsorbato, e outros) (LOVE et al., 2005; SCHREIBER, 2000).

Tendo em vista a grande variabilidade observada nas condições das SAMs confeccionadas devido às alterações dos parâmetros experimentais envolvidos, um grande número de técnicas tem sido empregado com o propósito de caracterizar tais sistemas incluindo técnicas microscópicas (microscopia de força atômica, microscopia de tunelamento com varredura, etc.) na investigação estrutural das SAMs em nível molecular, espectroscópicas (elipsometria, espectroscopia de fotoelétrons por raios-X, etc.) no estudo da dinâmica molecular nas SAMs bem como técnicas voltamétricas, amperométricas e

impedimétricas no estudo do comportamento de processos eletroquímicos e permeabilidade nestas estruturas (WHITESIDES e LAIBINIS, 1990; DAMOS et al., 2005; SCHREIBER, 2000; PETERLINZ e GEORGIADIS, 1996; HU e BARD, 1998; DANNENBERG et al., 1999).

Neste sentido, têm sido verificadas várias interessantes características destas estruturas, incluindo (LOVE et al., 2005; DUBOIS e NUZZO, 1992; ULMAN, 1996; WHITESIDES e LAIBINIS, 1990; DAMOS et al., 2005; SCHREIBER, 2000; PETERLINZ e GEORGIADIS, 1996; HU e BARD, 1998; DANNENBERG et al., 1999; SCHUCK, 1996):

1. capacidade de separar cargas na interface devido sua impermeabilidade ao solvente em conjunção com as características dielétricas das moléculas usadas como unidades (quando são empregados espaçadores com características dielétricas);
2. elevada flexibilidade das propriedades químicas mediante o controle da espessura do espaçador bem como do tipo e tamanho de grupo terminal empregado (controle do caráter ácido-base, catálise, orientação e conformação de proteínas eletroativas, etc.).

A partir das características apresentadas anteriormente fica evidente como tais sistemas podem ser extremamente propícios para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos devido ao possível uso das propriedades únicas destas estruturas ou mesmo a viabilidade do uso combinado das propriedades destes sistemas. Neste sentido, duas consequências igualmente importantes das propriedades das SAMs, enumeradas anteriormente, promissoras se aplicadas ao desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos são (1) a possibilidade de redução da corrente capacitiva que se desenvolve no sistema bem como (2) aumento na seletividade ou mesmo a eficiência faradaica (quando são tratados sistemas electrocatalíticos) destes dispositivos mediante a escolha de grupos terminais apropriados. Consequentemente, a combinação destes fatores, por exemplo em sistemas electrocatalíticos, pode favorecer enormemente o aumento da sensibilidade dos dispositivos confeccionados (ULMAN, 1996; HU e BARD, 1998; LOVE et al., 2005).

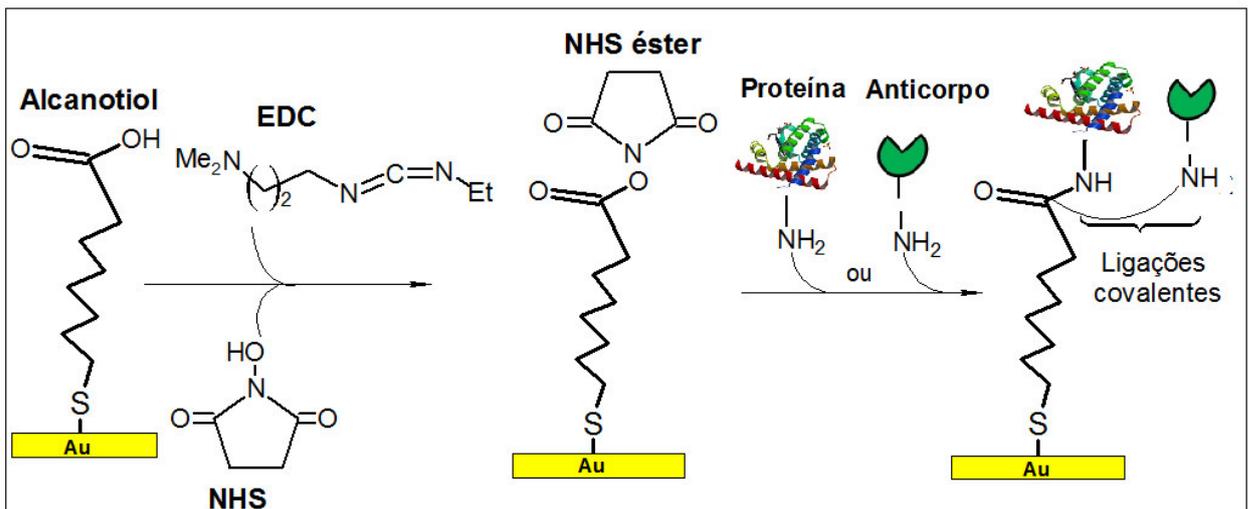
#### 2.6.1.2 Reações de ativação dos grupos terminações das SAMs

A parte terminal das SAMs é responsável pelas propriedades das mesmas, principalmente, por expor os seus grupos funcionais que, geralmente, incluem grupos  $-CH_3$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$  e  $-COOH$  (SAMANTA e SARKAR, 2011). Através destes é possível introduzir cargas na superfície das SAMs (KAKIUCHI et al., 2000), estabilizar nanopartículas metálicas (RAOOF et al., 2009) e imobilizar proteínas, antígenos ou anticorpos, na superfície de um transdutor com manutenção das propriedades (LEE et al., 2015), etapa fundamental para o

desenvolvimento de um imunossensor. Para Love e colaboradores (2005), uma das maneiras mais eficazes e estáveis de realizar a imobilização de proteínas reside na formação de ligações covalentes entre as SAMs e as biomoléculas. Este fato é alcançado, usualmente, através do acoplamento de grupos nucleofílicos presentes nas proteínas - grupos amino ou hidroxil, presentes nos resíduos de lisina - com os grupamentos carboxílicos terminais das SAMs.

Segundo Jonhsson e colaboradores (1991), para ativar a formação de uma ligação covalente amida ou éster entre os grupos carboxílicos e as proteínas, a ativação com reagentes carbodiimidas é a mais comumente utilizada. Carbodiimidas tais como DCC (dicicloexilcarbodiimida) são normalmente utilizadas em aplicações em química orgânica, porém em soluções aquosas, alternativas como o uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) são preferidas. O propósito do reagente carbodiimida é criar, inicialmente, um intermediário reativo aciluréia com o grupo carboxílico (ativação), seguido de reação com grupos nucleófilos fracos, como as proteínas. Contudo, em soluções aquosas a reatividade do intermediário é tão alta, que este rapidamente sofre hidrólise, retornando a forma de ácido carboxílico. Este efeito pode ser contornado através do uso adicional de um composto hidroxilado ativo, capaz de formar um derivado éster também reativo, porém, estável por um maior tempo. Nesta perspectiva, a N-hidroxissuccinimida (NHS) tem sido amplamente utilizada, pois apresenta alta solubilidade em água, toxicidade baixa e ótima reatividade (JONHSSON et al., 1991; ARYA et al., 2009; SAMANTA e SARKAR, 2011). A figura 8 descreve o processo descrito acima e as fórmulas estruturais do EDC e NHS.

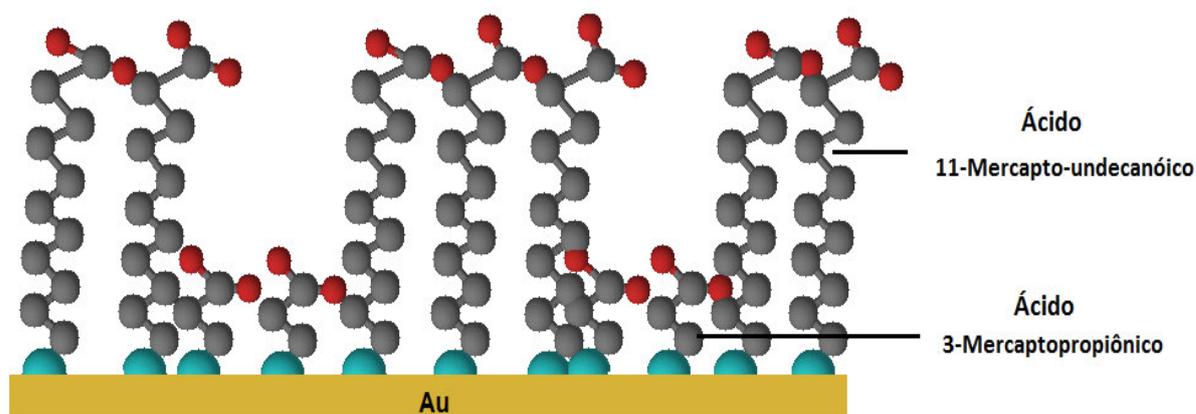
**Figura 8:** Esquema de imobilização covalente de uma proteína e seu anticorpo sobre uma SAM em superfície de ouro, através da ativação desta pela adição de uma mistura aquosa contendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS).



### 2.6.1.3 Composição das SAMs

As SAMs apresentam etapas de confecção bastante simples, que podem ser realizadas à temperatura ambiente e basicamente compostas pela imersão do substrato em um solvente orgânico contendo um ou mais alcanotíois (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002; SAMANTA e SARKAR, 2011). A utilização de monocamadas auto-organizadas compostas por diferentes adsorbatos (SAMs mistas) vem ganhando crescente destaque para o desenvolvimento de imunossensores (PREST et al., 2010; HUMBLLOT et al., 2009; GUISEPPI-ELIE et al., 2010; PARK et al., 2011). Neste tipo de sistema é possível obter uma SAM homogênea a partir da co-adsorção de uma mistura de alcanotíois, podendo ser um de cadeia carbônica curta e outro de cadeia carbônica longa (PARK et al., 2011). Uma das principais vantagens no uso de SAM mistas é o aumento na eficiência de imobilização de biomoléculas (antígenos ou anticorpos), uma vez que os alcanotíois de cadeias longas facilitam a exposição dos grupamentos carboxílicos para que a molécula se ligue covalentemente, enquanto que os de cadeia curta promovem um espaçamento entre as monocamadas reduzindo o impedimento estérico, facilitando a ligação de mais moléculas (CHOI et al., 2005). A figura 9 mostra a representação esquemática de uma SAM mista composta pelos tíois ácido 11-mercaptopropiônico (11-MUA) e ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), que apresentam cadeias carbônicas intermediárias longas e curtas, respectivamente.

**Figura 9:** Representação esquemática da distribuição de moléculas de alcanotíois 11-MUA e 3-MPA na composição de uma monocamada auto-organizada mista em superfície de ouro.



Fonte: Próprio autor

## 2.7 SPR e SAMs no desenvolvimento de imunossensores para detecção de marcadores cardíacos

Plataformas de detecção, baseadas em SPR utilizando monocamadas auto-organizadas, têm sido extensivamente estudadas e aplicadas para determinar diversos marcadores cardíacos. Para o diagnóstico de IAM, Masson e colaboradores (2004) desenvolveram um imunossensor baseado em SPR, para detecção, em tempo real, de Troponina I (TnI) e Mioglobina (Mb) cardíacas. Os autores utilizaram dextrano sobre SAM de 11-mercaptoundecanol para imobilizar anticorpos. O método desenvolvido, apresentou limite de detecção (LD) de  $2,9 \text{ ng.mL}^{-1}$  para a Mb, e de  $1,4 \text{ ng.mL}^{-1}$  para TnI.

Em 2007, Dutra e colaboradores desenvolveram um imunossensor de SPR baseado em monocamada auto-organizada (SAM) do tiol cisteamina para detecção em tempo real de Troponina T (TnT) cardíaca. O anticorpo da TnT foi covalentemente imobilizado sobre substrato de ouro através da monocamada, constituindo a superfície sensora. Este biossensor apresentou faixa de resposta linear entre  $0,05$  e  $4,5 \text{ ng.mL}^{-1}$  com boa reprodutibilidade. Além disso, a superfície do sensor foi regenerada por meio de uma solução de 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS), sem que o sensor perdesse a imunorreatividade.

Kim e colaboradores (2008) sintetizaram uma nova SAM à base de poli (tiofeno) com grupos éster NHS para imobilizar antígenos e anticorpos da proteína C-reativa (PCR) em substrato de ouro. A interação específica antígeno-anticorpo foi diretamente monitorada por SPR, apresentando excelente sensibilidade. Este estudo demonstrou que a técnica de SPR proporciona um método potencial para a detecção de PCR em aplicações clínicas.

Para imobilizar anticorpos da Troponina T (TnT), Liu e colaboradores (2011) utilizaram uma monocamada auto-organizada (SAM) mista, que consistia de uma mistura homogênea de oligo (etilenoglicol) (OEG) e ácido mercaptohexadecanóico (MHDA), sobre superfície de Au. A detecção de TnT, foi feita através de Ressonância de Plásmos de Superfície, e apresentou uma boa correlação linear ( $R = 0,991$ ) em concentrações inferiores a  $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  com limite de detecção (LD) de  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ . A SAM mista mostrou elevada capacidade de imobilização e o sistema proposto apresentou alta precisão, boa reprodutibilidade e forte potencial para ser aplicado no diagnóstico clínico rápido e detecção livre de etiqueta.

Também para detecção de TnT, recentemente Pawula e colaboradores (2016) utilizaram o ácido 11-mercapto-undecanóico (11-MUA) como modificador, e desenvolveram um sensor de SPR para a detecção dessa proteína em amostras de soro. Os autores utilizaram

nanopartículas de ouro conjugadas com o anticorpo da TnT para amplificar a resposta do imunossensor. Além disso, realizaram imunoenaios diretos e em sanduíche. O imunossensor de SPR mostrou boa reprodutibilidade para a detecção TnT na faixa de concentrações de 25-1000 ng.mL<sup>-1</sup> e de 5-400 ng.mL<sup>-1</sup>, para os ensaios diretos e em sanduíche, respectivamente. Para alcançar melhor sensibilidade, o desempenho do ensaio em sanduíche do imunossensor no soro humano foi avaliado utilizando anticorpos não modificados e modificados com nanopartículas de ouro. O limite de detecção para o imunossensor foi de 5 ng.mL<sup>-1</sup> de TnT para o ensaio em sanduíche padrão e 0,5 ng.mL<sup>-1</sup> de TnT para o sistema com anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro, dentro da faixa linear de 0,5-40 ng.mL<sup>-1</sup>. O imunossensor de SPR proposto apresentou potencial promissor a ser desenvolvido para testes point-of-care no diagnóstico precoce de infarto agudo do miocárdio (IAM).

Assim, pode-se dizer que as vantagens oferecidas pela técnica de SPR apresentam grande potencial para detectar e monitorar biomarcadores, em tempo real, livre de etiqueta, com pequeno gasto de material e possível aplicação para o diagnóstico individual.

# OBJETIVOS

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

A presente dissertação tem como objetivo geral a construção de filmes fundamentados em monocamadas auto-organizadas como plataformas para o desenvolvimento de um imunossensor explorando a interação entre antígenos e anticorpos de mioglobina por Ressonância de Plásmons de Superfície.

### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Produzir e caracterizar eletroquimicamente monocamadas auto-organizadas simples e mistas de ácido 11-mercaptopropiônico e ácido 3-mercaptopropiônico empregando voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e ressonância de plásmons de superfície;
- b) Avaliar o processo de adsorção de anticorpos de mioglobina sobre monocamadas auto-organizadas simples e mistas;
- c) Investigar o processo de interação anticorpo-antígeno de mioglobina e avaliar as características analíticas do imunossensor empregando SPR (sensibilidade, limite de detecção e faixa linear);
- d) Aplicar o imunossensor em amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina.

# **PARTE EXPERIMENTAL**

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

Antígenos (Ag) e anticorpos (Ac) de mioglobina (Mb), ácido 11-mercaptopundecanóico (11-MUA), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), dendrímero de poliamidoamina (PAMAM G5), ferricianeto de potássio -  $K_3[Fe(CN)_6]$ , ácido 4-(2-hidroxi-etil) piperazina-1-etanosulfônico (HEPES) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), fosfato de sódio dibásico anidro ( $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ ), cloreto de magnésio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), cloreto de cálcio dihidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ ), cloreto de amônio ( $NH_4Cl$ ), hidróxido de potássio (KOH), ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) PA, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) PA foram adquiridos da Isofar® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). TWEEN 20 (Polisorbato 20 ou surfactante P<sub>20</sub>) foi obtido da Vetec® Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Álcool etílico absoluto (99.5%) foi adquirido da quimex® S.A. (São Paulo, SP, Brasil).

A solução tampão HBS-EP pH 7,4 utilizada nas análises de SPR para as diluições do antígeno e anticorpo foi preparada a partir da mistura de soluções: 10,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Hepes pH 7,4; 3,0 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA pH 8,0; 150,0 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl e 0,005% do surfactante polissorbato 20. As soluções etanólicas dos tióis 3-MPA e 11-MUA, as soluções aquosas de SDS 1% e a mistura de EDC/NHS foram preparadas previamente ao uso.

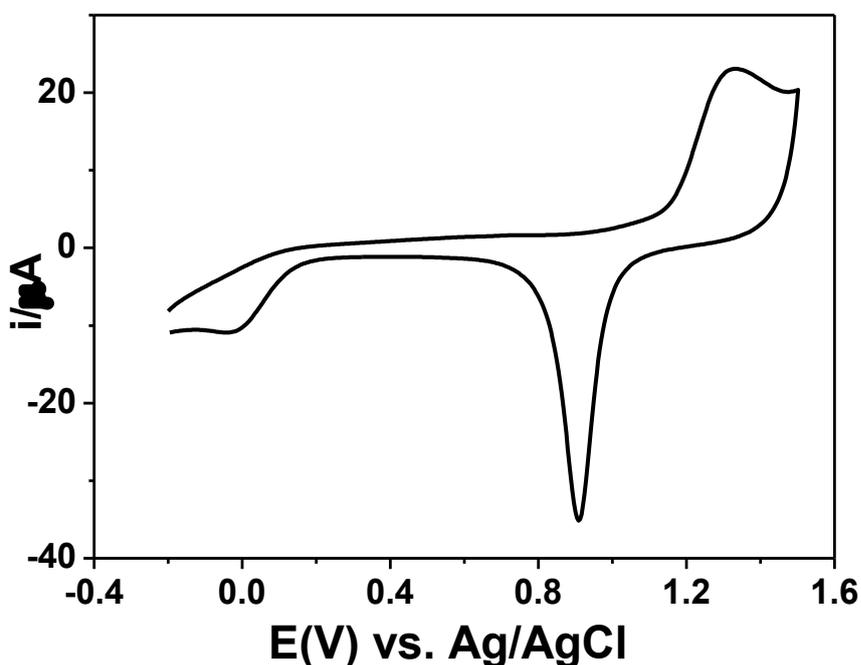
Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida em um sistema purificador de água via osmose reversa da GEHAKA®, modelo OS10LXE.

### 4.2 Limpeza da superfície de ouro

A limpeza da superfície de ouro é uma etapa de grande influência na formação das monocamadas auto-organizadas e foi realizada de forma sistemática, para garantir maior eficiência no processo de modificação da superfície de ouro. A limpeza do eletrodo de ouro

foi feita inicialmente realizando o polimento do mesmo em superfície não abrasiva contendo suspensão de alumina, seguida de limpeza eletroquímica por voltametria cíclica realizada em solução  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a uma velocidade de varredura ( $v$ ) de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  no intervalo de potencial ( $\Delta E$ ) entre  $-0,2$  e  $1,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$ . O perfil voltamétrico obtido da superfície de ouro limpa é mostrado na figura 10. Os picos anódico ( $E_a$ ) e catódico ( $E_c$ ) observados em aproximadamente  $1,3$  e  $0,9 \text{ V}$ , são característicos da oxidação do ouro a óxidos de ouro e redução dos óxidos a ouro elementar, respectivamente. Esse procedimento de limpeza foi realizado previamente a cada modificação do eletrodo de ouro visando à renovação da superfície do mesmo.

**Figura 10:** Voltamograma Cíclico típico, obtido para o eletrodo de ouro em solução  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $v$  de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $\Delta E$  de  $-0,2$  a  $1,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$ .



A limpeza dos discos de SPR foi feita através da imersão dos mesmos numa “solução piranha” (mistura 3:1 v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  PA e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%) durante aproximadamente 3 minutos. Esse procedimento foi realizado previamente a cada modificação dos discos de SPR.

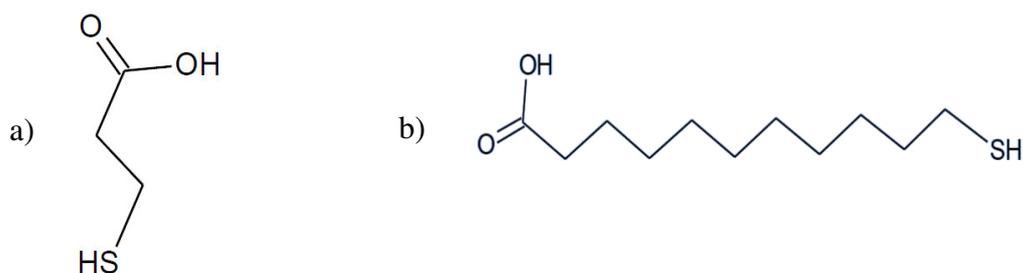
### 4.3 Formação e caracterização das SAMs na superfície de Ouro

A adsorção dos tióis na superfície eletródica previamente limpa foi realizada por meio da imersão dos eletrodos de ouro em solução etanólica do respectivo tiol, na

concentração de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , durante 24 horas. Previamente ao uso dos substratos, os mesmos foram lavados com etanol e água deionizada e secos à temperatura ambiente.

No presente trabalho, foram utilizados o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) (figura 11.a) e o ácido 11-mercpto-undecanóico (11-MUA) (figura 11.b), tióis de cadeia curta e longa, respectivamente

**Figura 11:** Fórmulas estruturais dos alcanotióis utilizados para a formação das monocamadas auto-organizadas: a) ácido 3-mercaptopropiônico e b) ácido 11-mercpto-undecanóico.



As modificações das superfícies de trabalho foram realizadas utilizando SAM's simples constituídas por apenas um alcanotiol (11-MUA ou 3-MPA) e SAM's mistas constituídas pelos dois tióis citados nas proporções de volume de 1:3 e 3:1. Em seguida cada uma dessas plataformas foi, então, submetida à caracterização eletroquímica através das técnicas de voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

#### 4.4 Equipamentos utilizados nas medidas eletroquímicas e ópticas

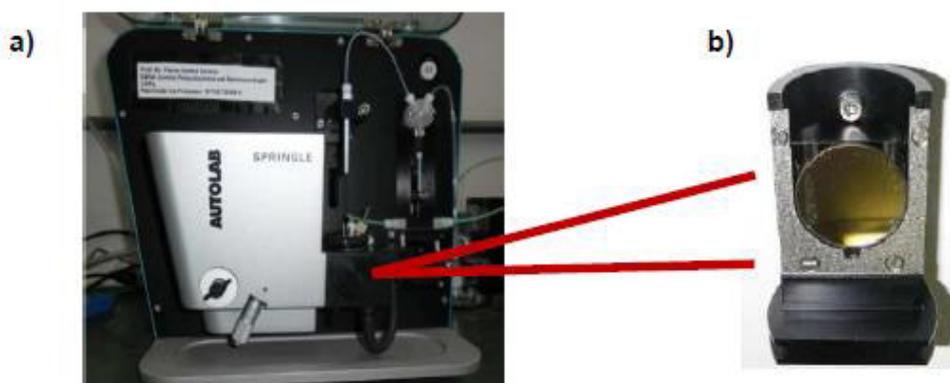
Para caracterizar eletroquimicamente os sistemas obtidos foram realizados estudos por voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em um potenciostato/galvanostato da Autolab (modelo PGSTAT 128N) acoplado a um microcomputador contendo os softwares GPES e FRA versão 4.9) (figura 12.a). As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de 5,0 mL, empregando um eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho (área =  $0,07065 \text{ cm}^2$ ), um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) como eletrodo de referência (figura 12.b).

**Figura 12:** Instrumentação utilizada nos estudos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Em (a) Potenciostato/galvanostato da Autolab (modelo PGSTAT 128N), em (b), da esquerda para direita, eletrodos de trabalho ( $0,07065 \text{ cm}^2$  de área), auxiliar e referência utilizados.



As análises de interações biomoleculares entre antígenos e anticorpos sobre as SAMs na superfície de ouro foram obtidas através de medidas do ângulo de SPR com um espectrômetro de SPR Autolab Springle (*Eco Chemie*) (figura 13.a). Este equipamento se baseia na configuração proposta por Kretschmann, na qual a parte óptica do sistema é compreendida por um prisma de vidro e um disco de ouro recoberto por um fino filme do metal, ambos obtidos na Metrohm-Autolab, Brasil (Figura 13.b). O equipamento também contém uma célula com capacidade de  $300 \mu\text{L}$ , com um laser de He-Ne com emissão em  $670 \text{ nm}$  que é usado como fonte de radiação e a detecção é feita por um detector do tipo fotodiodo. Os dados de variação do ângulo de SPR foram obtidos a partir do software *SPR Data Aquisition* (versão 4.4).

**Figura 13:** Espectrômetro de SPR Autolab Springle Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas. Em (a) espectrômetro de SPR Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas e em (b) disco de ouro utilizado como substrato nas análises colocado sobre o prisma de vidro.



## 4.5 Construção do imunossensor

### 4.5.1 Modificação dos substratos de SPR com SAMs mistas

Para a avaliação da capacidade de imobilização das SAMs através da técnica de SPR foram imobilizados anticorpos solúveis de mioglobina em discos modificados com SAMs simples e mistas (1:3 e 3:1) de 3-MPA e 11-MUA a fim de se obter a melhor resposta de sinal de SPR.

A modificação da superfície do disco de ouro de SPR para a formação das SAMs simples de 3-MPA e 11-MUA, bem como das SAMs mistas 1:3 e 3:1 (3-MPA:11-MUA) foi realizada através da imersão dos discos em soluções etanólicas dos respectivos tióis por um período de 24 horas. Após esse tempo de modificação o disco de ouro foi submetido a uma lavagem com etanol.

### 4.5.2 Ativação dos grupos terminais das SAMs

Para ativação dos grupamentos carboxílicos presentes nas terminações das SAMs de 3-MPA e 11-MUA foi realizada a adição de 100  $\mu\text{L}$  de uma mistura (1:1) contendo solução de EDC ( $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e NHS ( $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ) durante 20 minutos sobre a superfície do disco de ouro. As concentrações desses agentes de acoplamento e o tempo necessário para interação foram baseados em procedimentos já bem descritos na literatura (JONHSSON et al., 1991).

### 4.5.3 Imobilização do anticorpo solúvel de Mb sobre o disco sensor modificado com as SAMs

A adição do anticorpo de Mb foi monitorada em tempo real via deslocamento do ângulo de SPR em função do tempo. Após a ativação da superfície, o disco sensor foi acoplado ao prisma de vidro, pela adição de uma mistura de óleos com índice de refração final de  $1.5180 \pm 0.0002$ . A principal finalidade da utilização destes óleos é fixar o disco sem que ocorra a variação do índice de refração do sistema em relação ao do prisma, impedindo assim a formação de um novo meio quando sobre o prisma é adicionado o disco de ouro.

As medidas foram iniciadas a partir da adição de 50  $\mu\text{L}$  de tampão HBS-EP pH 7,4 para obtenção de uma linha de base. Em seguida foram injetados sobre a superfície 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo da Mb diluído no mesmo tampão em diferentes discos modificados com SAMs

simples de 3-MPA e 11-MUA e também SAMs mistas de 3-MPA/11-MUA (1:3 e 3:1). O ângulo de ressonância de plásmons de superfície foi monitorado durante 20 minutos.

Após a escolha da SAM mediante avaliação do deslocamento do ângulo de SPR, foram feitas medidas de diferentes concentrações (0,5; 2,5; 5; 10; 25; 37,5 e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do anticorpo da Mb em discos modificados com a SAM escolhida, e o perfil da resposta foi acompanhado durante 30 minutos. Após esse tempo a superfície foi lavada com 100  $\mu\text{L}$  de tampão HBS-EP pH 7,4 para a remoção de espécies fracamente ligadas à superfície.

#### 4.5.4 Detecção direta do antígeno de Mb através do imunossensor em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1)

Para mostrar a eficiência do sistema na detecção de antígenos de Mb, foram realizadas adições de diferentes concentrações da proteína sobre os discos modificados com a SAM mista e ativados com EDC/NHS. A concentração do anticorpo da Mb foi fixada em 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e foram variadas as concentrações do antígeno (100; 250; 500; 750 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A interação Ag/Ac foi monitorada através mediante o acompanhamento de  $\Delta\theta_{\text{SPR}}$  em função do tempo durante 30 minutos. Ao fim de cada adição foi realizada a lavagem do sistema com tampão HBS-EP, pH 7,4 para remover espécies que não se ligaram ou se ligaram fracamente à plataforma.

#### 4.5.5 Amplificação do sinal de SPR

Encontradas as condições ótimas das modificações com SAMs, foram utilizadas moléculas de poliamidoamina de geração 5 (PAMAM G5) para amplificar o sinal de SPR. O PAMAM G5 é um dendrímero que apresenta estrutura muito ramificada e regular. As estruturas dendríticas são chamadas de “moléculas em cascata” e foram relatadas pela primeira vez por Vögtl e colaboradores (BUHLEIER et al., 1978). Além disso, resultam em estruturas semiglobulares ou globulares de alta densidade funcional superficial, podendo fornecer plataformas de ligação, com grande capacidade de se ligar ou encapsular moléculas através de vários mecanismos, tais como o encapsulamento físico, interação eletrostática e conjugação covalente (BENTERS et al., 2001).

O PAMAM G5 foi adicionado sobre os discos de SPR já modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) e a incubação foi realizada por um período de tempo de 20 horas. Após esse período, o sistema foi lavado com etanol e ativado utilizando a solução de

EDC/NHS.

#### 4.5.6 Imobilização do anticorpo solúvel de Mb sobre o disco sensor modificado com SAM mista e PAMAM G5

As medidas para definir a concentração ideal do anticorpo de Mb foram feitas com a injeção de diferentes concentrações (0,5; 2,5; 5; 10; 25; 37,5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do anticorpo nos discos modificados com SAM mista/PAMAM G5 e ativados com EDC/NHS. Definida a concentração mais adequada ao sistema foram realizadas as medidas de interação Ac/Ag através de um ensaio sanduíche esquematizado da seguinte forma: disco modificado com SAM mista e PAMAM G5, seguido da ativação dos grupos terminais com EDC/NHS durante 20 minutos, seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo de Mb para imobilização durante 30 minutos, seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  do antígeno de Mb durante 30 minutos e, finalmente, injeção de 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo para monitorização do deslocamento do ângulo de SPR em função do tempo.

#### 4.5.7 Imunoensaio em sanduíche

Foram realizadas medidas através de ensaio em sanduíche para melhorar as condições de detecção das moléculas de Mb, uma vez que esta proteína apresenta baixo peso molecular. No ensaio em sanduíche, o anticorpo é imobilizado na superfície do disco sensor e a solução contendo o antígeno é adicionada por imunorreação, e em seguida, o anticorpo é injetado como anticorpo secundário. Segundo Pei e colaboradores (2002), esse método pode ser utilizado para aumentar a sensibilidade de um ensaio baseado em ligação antígeno-anticorpo, além de ser simples, eficaz e fácil de implementar.

Para o imunoensaio em sanduíche, inicialmente, a plataforma PAMAM G5/SAM MPA/MUA (3:1) foi ativada com EDC/NHS para receber o anticorpo de Mb (solução 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em seguida, o disco foi lavado com tampão HBS-EP pH 7,4 para remover excesso de material e de moléculas fracamente ligadas ao substrato gerando a plataforma Ac-Mb/PAMAM G5/SAM MPA/MUA. Em seguida, a plataforma foi exposta a diferentes concentrações de antígenos de Mb (0,001; 0,5; 0,8; 1 e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por um tempo de 30 minutos. Após a interação da plataforma com os antígenos de mioglobina, o disco foi novamente lavado com tampão HBS-EP pH 7,4 para remover o excesso de material e espécies com ligações fracas gerando Ag-Mb/Ac-Mg/PAMAM G5/SAM MPA/MUA. O disco foi em

seguida colocado no equipamento de SPR para monitorar a interação Ac-Mb/Ag-Mg através da injeção de 50  $\mu\text{L}$  de solução 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo. Após a injeção do Ac-Mb o ângulo de SPR foi monitorado em função do tempo durante 30 minutos.

#### 4.6 Preparo das amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina

Com o objetivo de avaliar o desempenho do sistema em análise de fluidos biológicos foram empregadas amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina. Optou-se por trabalhar com amostras sintéticas devido sua fácil preparação e aquisição de reagentes. O plasma sintético foi preparado segundo Liu e colaboradores (2006) e a urina sintética foi preparada segundo Laube e colaboradores (2001), ambas com pequenas modificações, segundo a Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ) das soluções de plasma sanguíneo (PSG, pH 7,4) e urina (pH 6.0) sintéticas.

COMPONENTE	PSG*	URINA*
NaCl	8.036	3.0
NaHCO <sub>3</sub>	0.352	-
KCl	0.225	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	1.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.238	-
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.311	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.293	1.0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.072	2.0
NH <sub>4</sub> Cl	-	1.0
Uréia	-	25

\*Solução preparada em água destilada e pH ajustado com NaOH

#### 4.7 Detecção de antígenos de Mb nas amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina

Para avaliar o desempenho do sensor as amostras de plasma e urina foram

contaminadas com antígenos de Mb nas concentrações 0,001; 0,5 e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O preparo foi realizado pela adição de quantidades conhecidas de Mb nas amostras que foram inicialmente diluídas em tampão HBS-EP, pH 7,4, na proporção 1:10 em volume. As amostras com antígenos da Mb foram adicionadas no disco modificado com o sistema SAM MPA-MUA/PAMAM G5/EDC-NHS/Ac-Mb durante um intervalo de tempo de 30 minutos. Em seguida, o disco sensor foi acoplado ao prisma e foram injetados 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo da Mb. A resposta de interação foi monitorada durante 30 minutos, seguido da lavagem com tampão HBS-EP, para remoção das espécies fracamente ligadas.

#### **4.8 Regeneração da superfície sensora**

A construção do imunossensor através da técnica de SPR apresenta a possibilidade de regeneração da superfície sensora após várias etapas de interação antígeno-anticorpo. A regeneração do imunossensor pode contribuir para uma redução significativa no custo das análises uma vez que possibilita a realização de inúmeras análises no mesmo ponto do sensor em um pequeno intervalo de tempo.

Para testar a capacidade de regeneração do imunossensor foi injetada sobre a superfície solução de SDS 1.0% (DUTRA et al., 2007; WU et al., 2013) descrita como uma solução com capacidade de promover a dissociação de biomoléculas. Neste sentido, foi realizada a adição do anticorpo da Mb ao sistema SAM MPA-MUA/PAMAM G5/EDC-NHS/Ac/Ag e a variação do ângulo de SPR foi monitorada durante 5 minutos, seguido de lavagem com tampão. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de SDS 1%, composto capaz de remover os anticorpos ligados aos antígenos imobilizados, e o sinal de SPR foi monitorado durante 2 minutos. Por fim, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão para lavagem do sistema e monitoramento do ângulo.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Construção e caracterização das monocamadas auto-organizadas (SAMs) em superfície de ouro

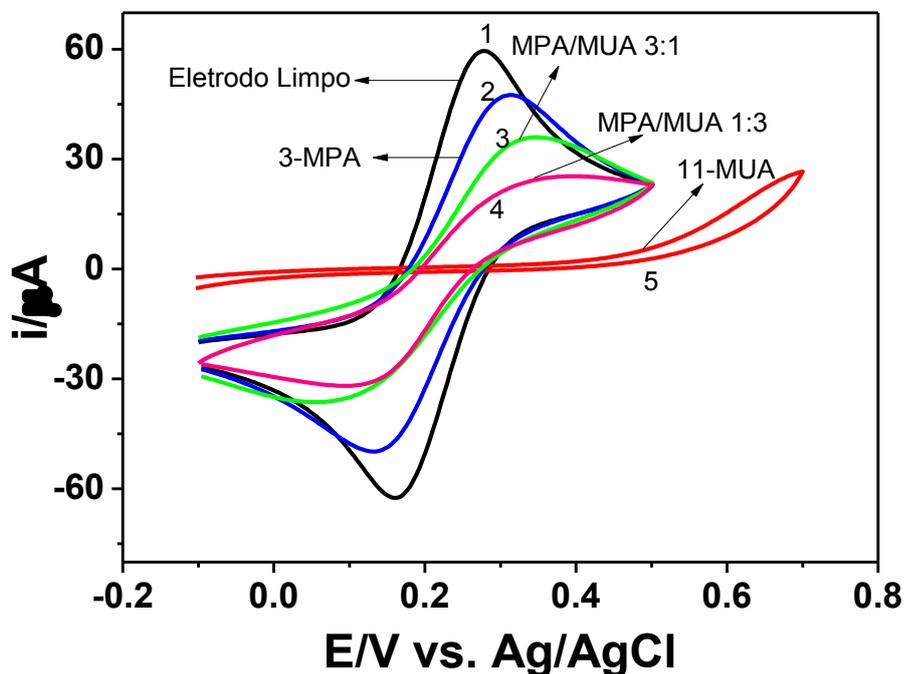
Para definir a composição final da SAM a ser utilizada nesse estudo, inicialmente, foram construídas sobre eletrodo de ouro, SAMs simples a partir de cada alcanotiol (11-MUA e 3-MPA) individualmente e SAMs mistas de diferentes proporções em volume dos alcanotióis (1:3 e 3:1 de 3-MPA/11-MUA). Para cada monocamada foi realizada a caracterização através da voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e dessorção redutiva (DR) por voltametria de pulso diferencial (VPD) para determinação da cobertura de superfície total ( $\Gamma$ ) do eletrodo.

#### 5.1.1 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por Voltametria Cíclica (VC)

A técnica de voltametria cíclica (VC), que tem sido amplamente utilizada para caracterizar a formação de SAMs em superfícies metálicas (FONSECA et al., 2011), permite a avaliação da influência de um modificador de superfície sobre a reversibilidade (caráter reversível, irreversível ou quase-reversível). Nesse sentido, a avaliação de processos redox de sondas eletroquímicas, como o hexacianoferrato de potássio -  $K_3[Fe(CN)_6]$  - representa uma importante ferramenta eletroquímica para o monitoramento da modificação de superfícies metálicas com SAMs formadas a partir de moléculas com cadeias carbônicas hidrofóbicas (CHIDSEY e LOIACONO, 1990).

A figura 14 mostra os voltamogramas obtidos para o eletrodo de ouro não modificado e para o eletrodo modificado com SAMs simples de 3-MPA e 11-MUA e SAMs mistas de 3-MPA/11-MUA nas proporções 1:3 e 3:1 dos respectivos tióis. Todos os voltamogramas para o eletrodo modificado frente aos processos redox de solução  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  da sonda de  $K_3[Fe(CN)_6]$  em  $KCl 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram obtidos após um tempo de adsorção de 24 horas. A curva 1 refere-se ao comportamento redox da sonda sobre o eletrodo não modificado. Conforme pode ser observado, há um par redox com potenciais de pico em 0,29 V vs. Ag/AgCl e 0,17 V vs. Ag/AgCl referentes à oxidação e redução da sonda redox, respectivamente. Ou seja, a sonda apresenta um comportamento típico de sistemas reversíveis com dois picos bem definidos.

**Figura 14:** Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo não modificado (curva 1) e eletrodo modificado com as SAMs simples e mistas formadas com os tióis: 3-MPA (curva 2), 11-MUA (curva 5), 3-MPA/11-MUA 3:1 (curva 3), 3-MPA/11-MUA 1:3 (curva 4). Os voltamogramas foram obtidos em  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ferricianeto em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, v  $50 \text{ mVs}^{-1}$  e  $\Delta E$  de  $-0.1$  a  $0.5 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl.



Observando a curva 5 na figura 14, verifica-se que a SAM formada pelo 11-MUA, de cadeia longa, apresenta passivação da superfície eletródica com total isenção da ocorrência de processos faradaicos no sistema. Provavelmente, isto se explica pelo fato de que SAMs formadas por alcanotióis de cadeias mais longas contendo dez ou mais átomos de carbono, como o 11-MUA, dificultam a oxidação e redução de espécies eletroativas, o que resulta em grande redução das correntes faradaicas provenientes da sonda redox (FUJIHARA et al., 2007).

Ao contrário do que se observa na curva 5, percebe-se no voltamograma representado pela curva 2 que a SAM formada pelo 3-MPA não bloqueia os processos de oxidação e redução da sonda eletroquímica sobre o eletrodo de ouro, pois permite a transferência eletrônica entre  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  e o metal. Nesse caso, a curva apresenta um perfil quase reversível com queda da corrente de pico do par redox.

O perfil voltamétrico da curva 4 representa o comportamento da sonda frente ao eletrodo modificado com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (1:3), mostrando uma menor inibição da eletroatividade da sonda quando comparado com a curva 5 que representa a SAM do alcanotiol 11-MUA. Adicionalmente, a curva 3 que corresponde à SAM mista 3-MPA/11-

MUA (3:1), apresenta perfil intermediário entre as curvas 2 e 4, mostrando menor transferência eletrônica entre a sonda e o substrato quando comparado ao eletrodo modificado com 3-MPA (curva 2) e menor passivação da sonda redox quando comparado ao eletrodo modificado com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (1:3). Tal comportamento justifica-se pelo fato de a SAM mista de proporção 3:1 apresentar maior quantidade do tiol de cadeia curta 3-MPA.

Para corroborar as informações obtidas por VC e avaliar a resistência à transferência eletrônica das SAMs formadas foram também realizados estudos de caracterização dos sistemas por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), detalhados a seguir.

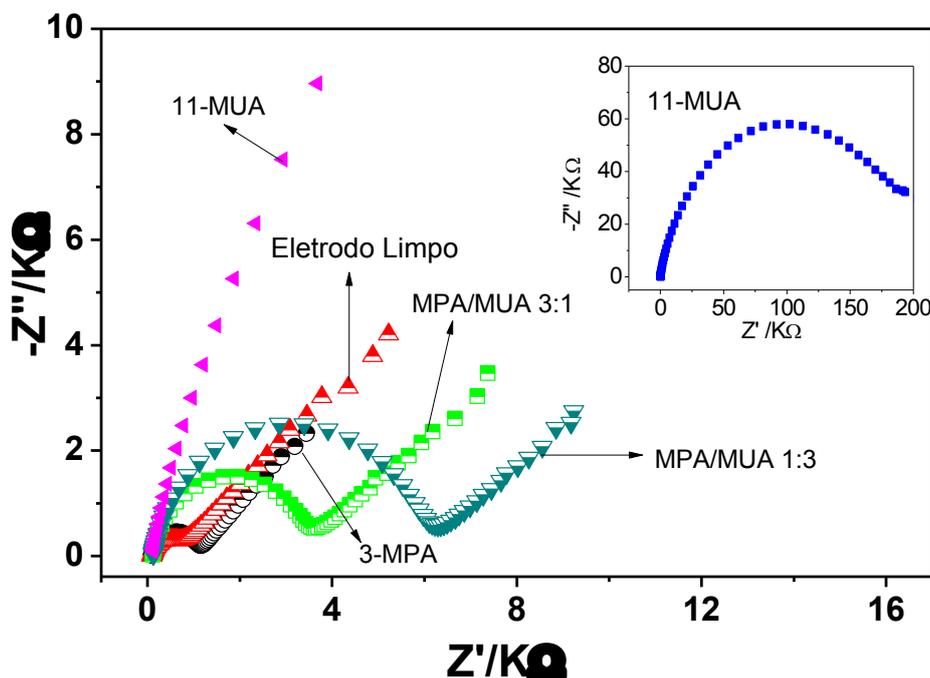
### 5.1.2 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Para avaliar a integridade estrutural das SAMs e determinar a resistência à transferência de carga entre as superfícies modificadas e a sonda redox, foi utilizada a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). Essa técnica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude, o que permite a avaliação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio (DAMOS et al., 2004).

Uma das formas de representar os dados de EIE é através do Diagrama de Nyquist (gráficos de  $Z'$  vs  $Z''$ ), uma poderosa ferramenta na mensuração da resistência à transferência eletrônica ( $R_{te}$ ) em reações eletroquímicas envolvendo espécies eletroativas e superfícies de eletrodos (YANG, et al., 2004). De forma geral, nesses espectros existem uma região de semicírculo e uma região linear. Enquanto a região linear está relacionada ao processo difusional, o semicírculo corresponde ao processo de transferência eletrônica, de modo que o diâmetro deste corresponde à magnitude da resistência à transferência eletrônica na superfície do eletrodo.

A figura 15 representa os diagramas de Nyquist obtidos das medidas de EIE realizadas em eletrodo de ouro não modificado e modificado com as SAMs simples e mistas.

**Figura 15:** Diagrama de Nyquist (gráfico  $Z''$  vs.  $Z'$ ) para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica realizadas para caracterização das SAMs. A sonda redox utilizada foi hexacianoferrato de potássio  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A amplitude foi  $10 \text{ mV}$  e a faixa de frequência de  $0,1$  a  $105 \text{ Hz}$ . Todas as medidas foram obtidas em potencial aplicado.



Conforme pode ser observado nas análises dos resultados obtidos pela EIE na figura 15, a curva que representa a sonda sobre o eletrodo não modificado mostra uma região de semicírculo muito pequena, uma vez que apresenta baixíssima resistência a transferência eletrônica ( $R_{te} = 0.64 \text{ k}\Omega$ ). Por outro lado, a curva que representa o eletrodo modificado com o alcanotiol de cadeia longa (11-MUA) apresentou um diâmetro do semicírculo consideravelmente maior resultando em um alto valor de  $R_{te}$  correspondente a  $150 \text{ k}\Omega$ . A resistência à transferência eletrônica para o eletrodo modificado com 3-MPA foi bem inferior à do eletrodo modificado com 11-MUA e superior àquela observada para o eletrodo não modificado ( $R_{te} = 1.06 \text{ k}\Omega$ ).

Os resultados obtidos para as SAMs mistas compostas pelos dois tióis 3-MPA/11-MUA mostram diferentes valores de  $R_{te}$ . Para o eletrodo modificado com a proporção 1:3 o valor de  $R_{te}$  apresentado é menor que a do eletrodo modificado com 11-MUA, porém é maior que todas as outras modificações e, conseqüentemente maior que a  $R_{te}$  do eletrodo não modificado ( $R_{te} = 5.55 \text{ k}\Omega$ ). Já a SAM mista de proporção 3:1 apresentou uma  $R_{te}$  intermediária, maior que os valores das curvas 2 e 3, e menor que os valores das curvas 1 e 5 ( $R_{te} = 3.80 \text{ k}\Omega$ ). Diante do exposto, os sistemas estudados apresentam os valores de  $R_{te}$  com

aumento na seguinte ordem: eletrodo não modificado < eletrodo modificado com 3-MPA < SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) < SAM mista 3-MPA/11-MUA (1:3) < 11-MUA.

Uma vez que o parâmetro  $R_{te}$  é uma medida da capacidade de bloqueio dos filmes em monocamadas em relação à reação de transferência de carga, quanto mais alto o valor de  $R_{te}$  maior o comportamento de bloqueio das SAMs (BRADBURY et al., 2008; LU et al., 2008). Logo, pode-se dizer que os dados de EIE confirmam a tendência já observada nos resultados obtidos por VC para cada SAM formada. Para avaliar as diferenças no recobrimento de superfície do eletrodo, foram realizados estudos de dessorção eletroquímica através da Voltametria de Pulso Diferencial para as diferentes SAMs. Os resultados estão descritos a seguir.

### 5.1.3 Caracterização das SAMs em superfície de ouro por dessorção redutiva (DR)

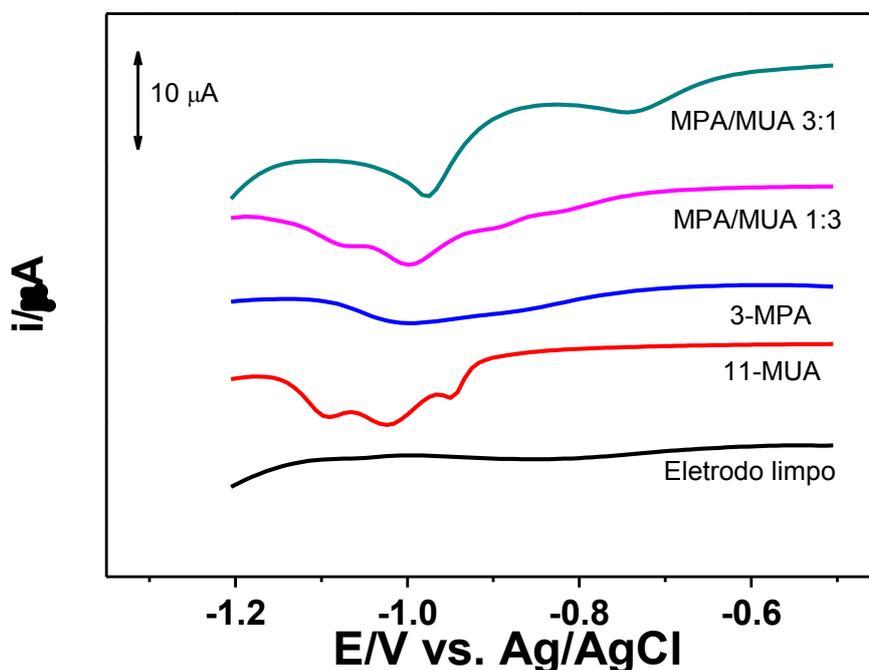
Os alcanotióis podem ser eletroquimicamente dessorvidos da superfície do ouro e de outros metais quando são aplicados potenciais suficientemente negativos. Essa dessorção ocorre favoravelmente em meio alcalino ( $pH > 11$ ), e pode ser desenvolvida mediante a oxidação ou redução dos tióis. No processo de dessorção oxidativa, ocorre perda de três elétrons enquanto na dessorção redutiva há o ganho de um elétron (WALCZAK et al., 1991). Sendo assim, a corrente de pico catódica ( $I_c$ ), observada em aproximadamente -1,0 V, no voltamograma de pulso diferencial, indica a redução do tiol via um elétron. A carga,  $Q$ , envolvida nos processos faradaicos, obtida por integração da corrente elétrica, permitindo a estimativa do valor de recobrimento superficial ( $\Gamma$ ) através da equação 3:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (3)$$

Onde  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação,  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485,40 \text{ C mol}^{-1}$ ) e  $A$  é a área geométrica do eletrodo.

Assim, para investigar o grau de cobertura das SAMs formadas em relação à cobertura de superfície, foram realizadas medidas de redução dessortiva através da técnica voltametria de pulso diferencial (VPD). A curva que se refere ao eletrodo não modificado é consistente com a ausência de processos dessortivos. Já os demais voltamogramas exibiram picos típicos à dessorção redutiva dos tióis na superfície de ouro, conforme observado na figura 16.

**Figura 16:** Medidas de DR feitas através da técnica de VPD realizada em eletrodo não modificado e modificado com as SAMs simples e mistas após tempo de interação de 24 horas. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KOH,  $v$  de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $50 \text{ mV}$  de amplitude de pulso e  $\Delta E$  de  $-0,2$  a  $-1,3 \text{ V vs Ag/AgCl}$ .



Os resultados obtidos mostram a presença de picos duplos no processo dessortivo de algumas SAMs. A presença de dois picos de dessorção é motivo de especulações e controvérsias, porque, a princípio, os dois picos não podem ser simplesmente atribuídos a um fenômeno realizado via um elétron como é considerada a dessorção redutiva. Contudo, a origem de um segundo pico é ora atribuída aos diferentes domínios cristalinos na superfície do ouro (WALCZAK et al., 1991, WEEISHAAR et al., 1992), ora a um rearranjo de aglomerados de tióis formados devido a uma indução de campo durante a dessorção destas espécies (YANG et al., 2001, VERICAT et al., 2010).

Na tabela 3 estão relacionados os valores de  $\Gamma$ , determinados para cada SAM, simples e mista, formadas pelos tióis 11-MUA ( $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e 3-MPA ( $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ).

**Tabela 3:** Valores da quantidade de carga (Q) associada com a redução de espécies na superfície e cobertura de superfície ( $\Gamma$ ) encontrados para eletrodo de ouro modificado por SAMs simples e mistas formadas por 3-MPA (1,0 mmol L<sup>-1</sup>) e 11-MUA (1,0 mmol L<sup>-1</sup>), após tempo de interação de 24 horas.

SAM	$Q/c$ (x 10 <sup>-7</sup> )	$\Gamma$ /mol cm <sup>-2</sup>
3-MPA	3,8	5,35 x 10 <sup>-11</sup>
11-MUA	7,9	11,58 x 10 <sup>-11</sup>
MPA/MUA 1:3	6,4	9,38 x 10 <sup>-11</sup>
MPA/MUA 3:1	8,1	11,88 x 10 <sup>-11</sup>

A tabela 3 deixa evidente que a cobertura de superfície depende da natureza das SAMs. Conforme observado, a monocamada mista MPA/MUA 3:1 apresentou uma cobertura de superfície um pouco superior às demais monocamadas auto-organizadas, o que deve torná-las diferentemente hábeis na imobilização de anticorpos de mioglobina.

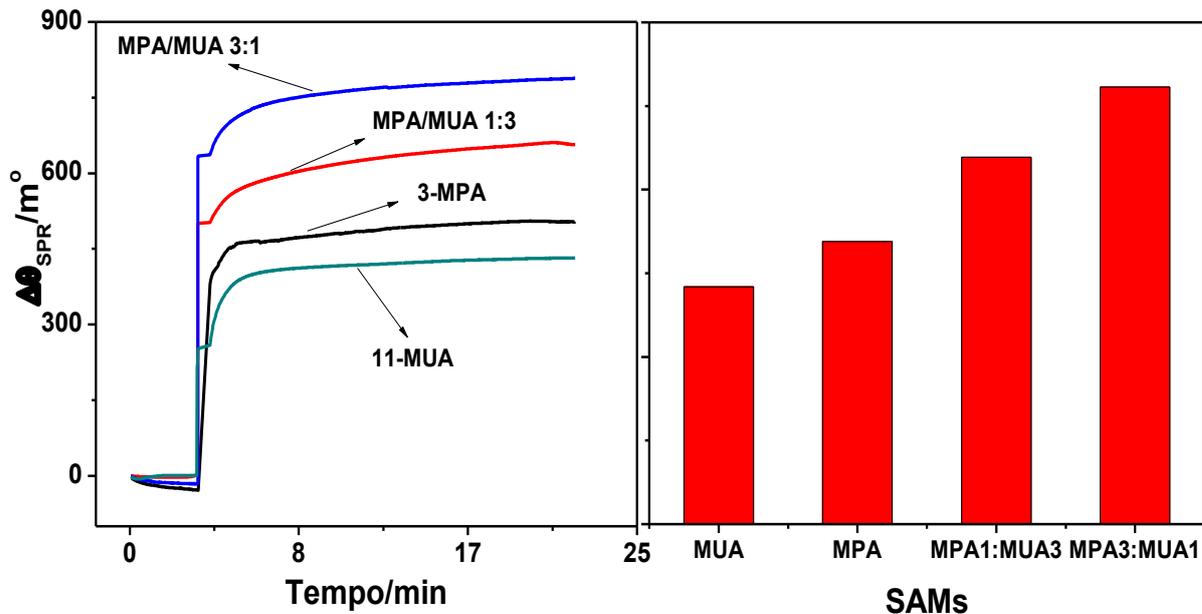
Assim, após as caracterizações eletroquímicas das SAMs formadas a partir de alcanotióis, foram realizadas medidas para verificar a capacidade de imobilização de anticorpos da mioglobina pelas mesmas, utilizando-se a técnica da Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR), como descrito a seguir nas etapas de construção da plataforma sensora.

## 5.2 Etapas de construção do imunossensor

### 5.2.1 Imobilização de Anticorpos de Mb sobre o disco de ouro

Para verificar a capacidade de imobilização de anticorpos da mioglobina em cada uma das SAMs, foram realizadas medidas por ressonância de plásmons de superfície. A figura 17 mostra os sensogramas e o gráfico de barras inserido, referentes à imobilização de anticorpos de Mb.

**Figura 17:** Sensogramas e gráfico com valores médios de deslocamento de ângulo de SPR referentes à imobilização de antígenos da Mb ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



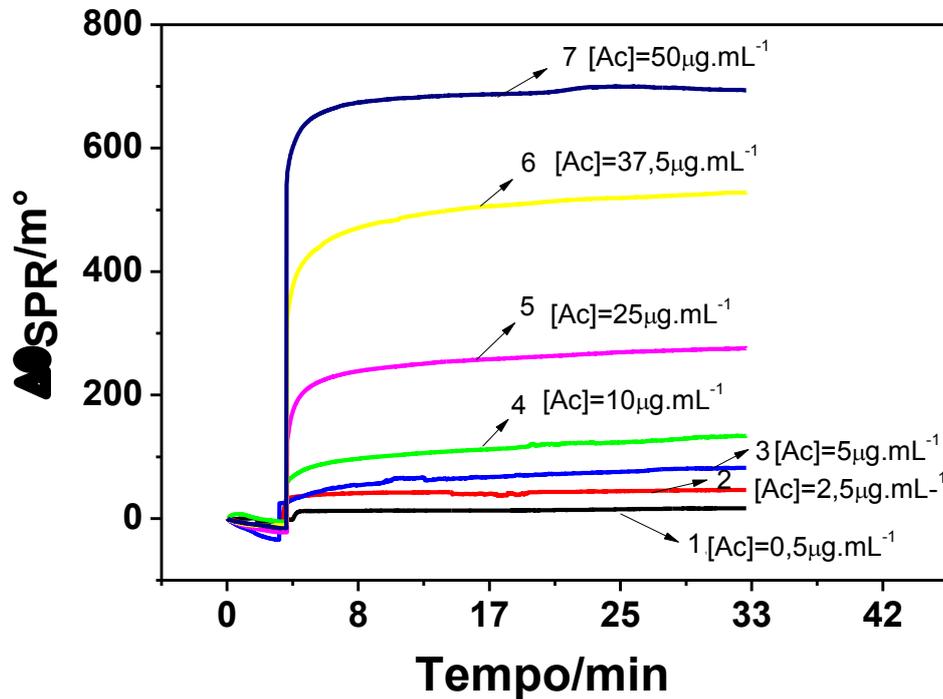
De acordo com os resultados observados nos sensogramas e gráfico inseridos na figura 17, percebe-se que a maior variação do ângulo de SPR foi alcançada na imobilização do anticorpo da Mb no disco modificado com a SAM mista 3-MPA/11-MUA na proporção 3:1. Esse resultado é consistente com a literatura, que descreve que organizados moleculares mistos de cadeias curtas e longas apresentam maior exposição dos sítios ativos e menor efeito de impedimento estérico. Tais características possibilitam uma melhor imobilização de diferentes biomoléculas, tais como DNA, enzimas, antígenos ou anticorpos, na superfície dos grupamentos terminais (PATEL et al., 1998; LEE et al., 2015).

Desse modo, optou-se por utilizar a SAM mista MPA/MUA 3:1 como plataforma para imobilizar as moléculas de mioglobina.

### 5.2.2 Imobilização de Anticorpos de Mb sobre o disco de ouro com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1)

Após a escolha da SAM a ser utilizada para modificação dos discos de SPR, foram realizados estudos da interação da SAM mista de 3-MPA/11-MUA (3:1) ativada com EDC/NHS frente a soluções de diferentes concentrações do anticorpo de Mb. Os respectivos sensogramas obtidos estão representados na figura 18.

**Figura 18:** Sensogramas referentes à associação do anticorpo da Mb a partir de soluções de diferentes concentrações:  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 1);  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 2),  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 3),  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 4);  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 5);  $37,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 6) e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (curva 7). O deslocamento do ângulo de SPR ( $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ ) foi monitorado durante 30 minutos.

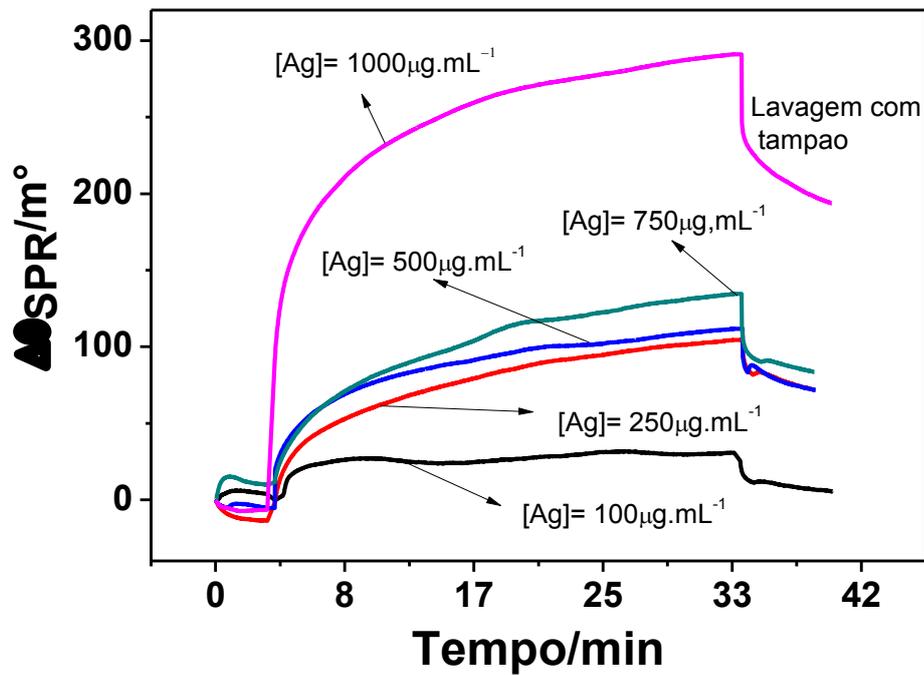


Conforme observado, o aumento das concentrações do anticorpo (curvas de 1 a 7) resultou no aumento relativo do ângulo de SPR devido ao aumento da concentração de superfície de anticorpos de mioglobina, mostrando assim, a eficiência da SAM confeccionada para imobilizar os anticorpos da Mb. Contudo, com o propósito de reduzir os custos na produção do imunossensor, a concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo foi empregada para a construção dos imunossensores usados nos estudos subsequentes

### 5.2.3 Detecção direta do antígeno de Mb através do imunossensor em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1)

A figura 19 mostra os sensogramas obtidos pela detecção direta de diferentes concentrações de antígenos de mioglobina.

**Figura 19:** Sensogramas referentes à associação do antígeno da Mb a partir de soluções de diferentes concentrações (100; 250 ; 500; 750 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



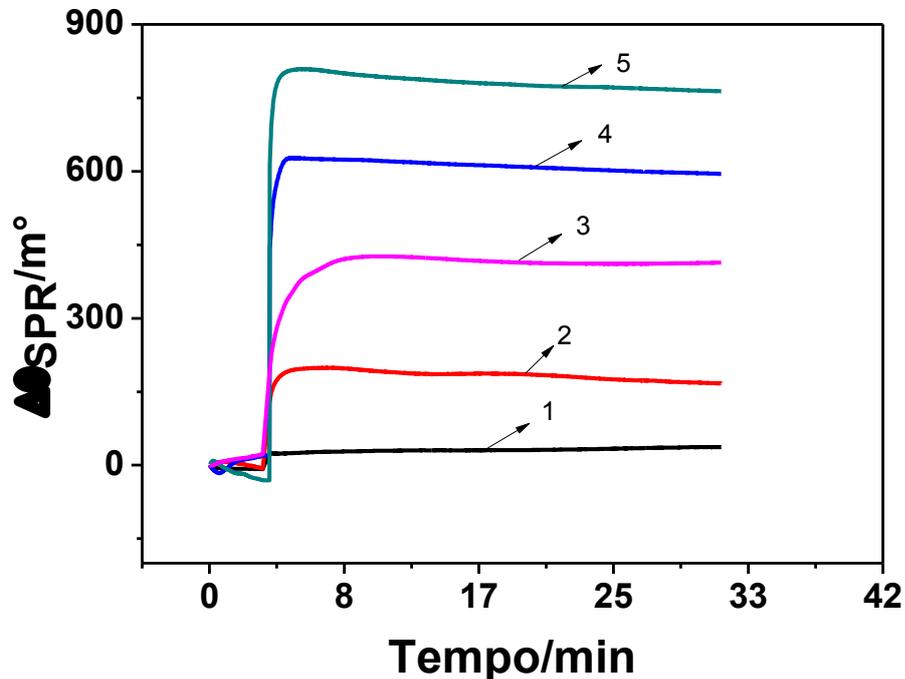
Observa-se nos sensogramas da figura 19 um deslocamento no ângulo de SPR para valores mais positivos em consequência da interação Ac/Ag da Mb. Porém, o aumento nos valores de  $\Delta\theta_{\text{SPR}}$  foram pequenos mesmo para elevadas concentrações de mioglobina, o que pode ser atribuído ao pequeno tamanho e baixo peso (17,8 kDa) da mesma.

No intuito de amplificar o sinal de SPR, foi proposto um sistema utilizando o dendrímero PAMAM G5, utilizado na modificação dos discos de ouro, juntamente com aSAM MPA/MUA (3:1). Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

#### 5.2.4 Imobilização de anticorpos de Mb sobre o disco de ouro com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) e o PAMAM G5

A ligação entre moléculas utilizando um sistema com dendrímeros apresenta grande eficiência pela grande capacidade de imobilização e estabilidade associadas a essas moléculas (BENTERS et al., 2001). Assim, optou-se pelo uso do PAMAM G5 para aumentar o número da população de anticorpos imobilizados sobre a superfície do disco sensor de forma a garantir maior interação Ac/Ag da mioglobina. Os resultados obtidos da imobilização dos anticorpos estão na figura 20.

**Figura 20:** Sensogramas referentes à associação do anticorpo da Mb sobre os discos modificados com SAM MPA/MUA e PAMAM G5, a partir de soluções de diferentes concentrações (3,5; 12,5; 25; 37,5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O deslocamento do ângulo de SPR ( $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ ) foi monitorado durante 30 minutos.



Na figura 20 são apresentados os sensogramas referentes à interação da plataforma PAMAM G5/SAM MPA-MUA/Au com soluções de anticorpos de mioglobina de diferentes concentrações. Observa-se um aumento do ângulo de SPR com o aumento nas concentrações do anticorpo de Mb ((1) 3,5; (2) 12,5; (3) 25; (4) 37,5 e (5) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esse aumento se deve ao aumento do número de moléculas acopladas à superfície ativada, mostrando assim, a eficiência do sistema PAMAM G5/SAM MPA-MUA/Au para imobilizar os anticorpos da mioglobina.

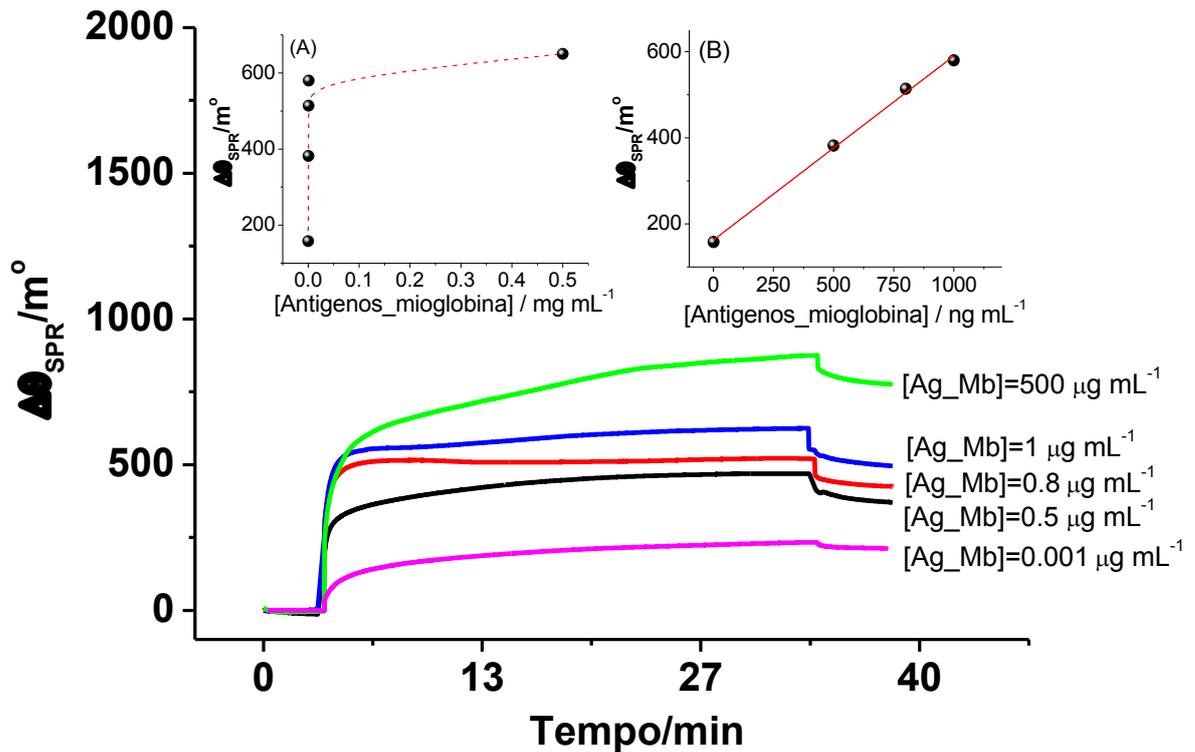
Com o propósito de reduzir custos, foi escolhida a concentração de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo para a construção do imunossensor e aplicação da mesma nos estudos subsequentes.

### 5.2.5 Detecção do antígeno de Mb através do Ensaio Sanduíche em discos modificados com a SAM mista 3-MPA/11-MUA (3:1) e PAMAM G5

A figura 21 mostra os sensogramas correspondentes às diferentes concentrações de antígeno da mioglobina, que foram adicionadas aos discos modificados com a plataforma Ac-Mb/PAMAM G5/SAM MPA/MUA. Como se observa, há uma notável amplificação do

signal de SPR. Possivelmente, este aumento na resposta do sinal ocorreu devido à estrutura tridimensional do dendrímero, o que proporcionou uma área acessível maior para a interação entre os anticorpos e antígenos da mioglobina. Além disso, em condições experimentais selecionadas, o ensaio em sanduíche confere naturalmente ao sistema amplificação do sinal quando comparado à imunorreação direta (LIU, X., et al., 2004).

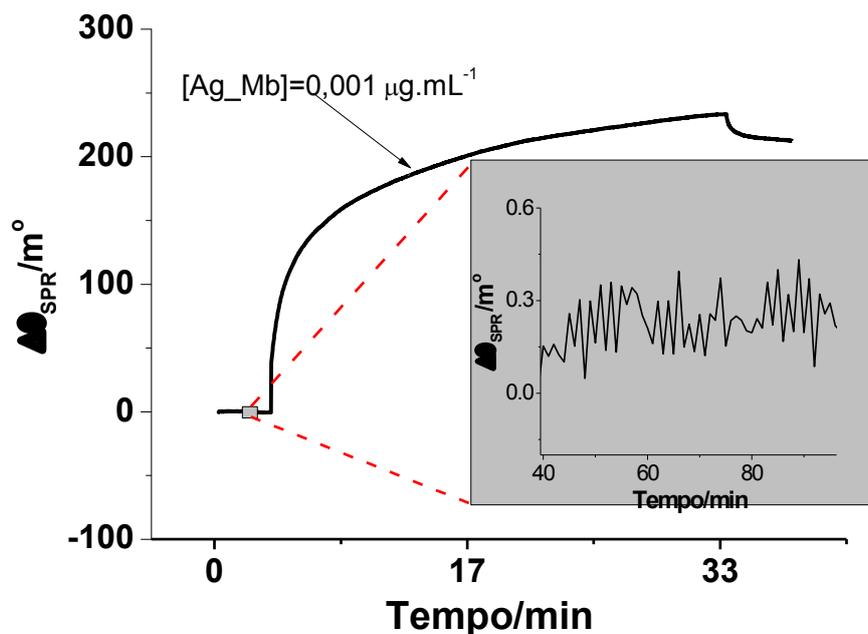
**Figura 21:** Sensogramas referentes ao imunoenensaio em sanduíche, mostrando a interação do sistema Ac/Ag/Ac com diferentes concentrações de Ag (0,001; 0,5; 0,8; 1 e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O deslocamento do ângulo de SPR ( $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ ) foi monitorado durante 30 minutos.



A figura (A) inserida à figura 21 deixa evidente que o ângulo de ressonância de plásmons de superfície varia com a concentração de antígeno de mioglobina de forma crescente no tempo de 10 minutos. Contudo, a relação entre  $\Delta\theta_{\text{SPR}}$  e a concentração de Ag-Mb apresentou um desvio acentuado da linearidade para concentrações de Ag-Mb superiores a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que ocorre, provavelmente, devido à saturação da superfície sensora. A figura inserida (B) deixa evidente que o sistema apresentou uma correlação linear entre a concentração de Ag-Mb e  $\Delta\theta_{\text{SPR}}$  no intervalo de concentrações compreendido entre 0,001–1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A correlação entre ângulo SPR e concentração de Ag-Mb na faixa 0,001–1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  é representada matematicamente pela equação  $\Delta\theta_{\text{SPR}} / \text{m}^\circ = 157,1 (\pm 6,6) + 449,7 (\pm 9,7) [\text{Antígenos de mioglobina} / \mu\text{g.mL}^{-1}]$  cujo coeficiente de correlação  $R^2$  foi 0,996. O limite de detecção para a Ag-Mg, determinado como sendo a concentração correspondente a uma razão sinal/ruído igual a 3 (figura 22), foi de 0,00067  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 22:** Sensograma referente ao imunoenensaio em sanduíche para a concentração de 0,001  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de antígeno de mioglobina. Figura inserida: Ampliação da linha de base referente à região de leitura do tampão de trabalho (HBS-EP).



#### 5.2.6 Aplicação do sensor em amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina

Com o propósito de avaliar o desempenho do imunossensor proposto para a determinação de antígenos de mioglobina foram conduzidos testes de adição e recuperação em amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina. Neste sentido, as amostras de plasma e urina artificiais foram fortificadas com três diferentes níveis de antígenos de mioglobina (0,001  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente). As concentrações antes e após a adição de antígenos de mioglobina nas amostras são apresentadas na tabela 4.

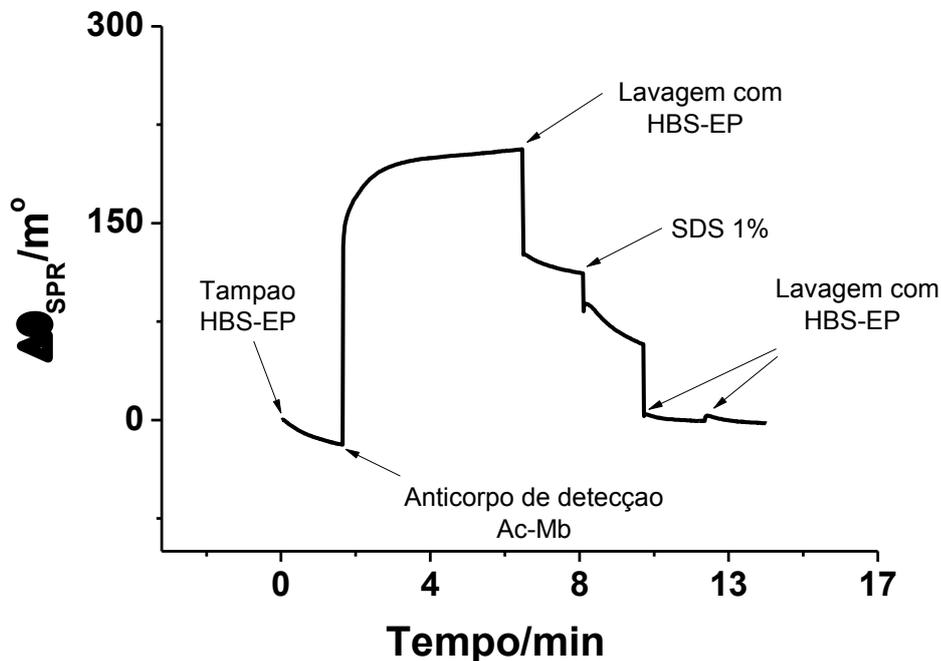
**Tabela 4:** Valores adicionados, encontrados e recuperados de Ag-Mb em amostras de plasma e urina artificiais.

Amostra	Adicionado / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Encontrado / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Recuperação / %
Plasma artificial	0	0	-
	0,001	0,00095	95
	0,5	0,48	96
Urina artificial	0	0	-
	0,001	0,00106	106
	0,5	0,468	94

### 5.2.7 Regeneração da superfície sensora

De acordo com o sensograma representado na figura 23, SDS 1% atua como agente de regeneração de forma a regenerar a capacidade de detecção do sensor. Pode-se também observar que a linha de base do sistema foi recuperada após a adição do agente de regeneração e subsequente lavagem da superfície, o que indica que o surfactante aniônico SDS esteja atuando desfazendo as ligações antígeno-anticorpo de forma a remover os anticorpos de detecção e preservando a imunorreatividade do sistema SAM MPA-MUA/PAMAM G5/EDC-NHS/Ac-Mb para subseqüentes análises.

**Figura 23:** Sensograma referente ao ensaio de regeneração da superfície do imunosensor empregando-se SDS 1.0%.



# CONCLUSÃO

## 7 CONCLUSÃO

Considerando o conjunto dos dados obtidos nos diferentes experimentos conduzidos ao longo do presente estudo é possível concluir que:

- a) Neste trabalho foi desenvolvido com sucesso um imunossensor fundamentado em Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção de antígenos da mioglobina através da imobilização covalente do anticorpo da Mb incubado em dendrímero PAMAM G5 sobre monocamadas auto-organizadas mistas de 3-MPA/11-MUA em superfície de ouro, capaz de detectar de forma rápida e sensível essa pequena proteína.
- b) A amplificação do sinal de SPR pela plataforma PAMAM G5/SAM MPA-MUA/Au ativada com EDC/NHS indica que a estrutura tridimensional do dendrímero PAMAM G5 permite uma maior imobilização dos anticorpos da Mb.
- c) O imunoenensaio em sanduíche amplificou o sinal de interação antígeno-anticorpo da Mb, mostrando que os resultados com esse tipo de ensaio apresentou vantagens potencialmente significativas na sensibilidade do imunossensor baseado em SPR.

Portanto, pode-se dizer que o imunossensor fundamentado em ressonância de plásmons de superfície para detecção de antígenos da mioglobina através do ensaio em sanduíche sobre a plataforma PAMAM G5/SAM MPA-MUA/Au ativada com EDC/NHS, mostrou ser uma poderosa ferramenta, uma vez que permitiu análise em tempo real e detecção de baixas concentrações dessa proteína ( $0,00067 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Dessa forma, o sistema proposto apresenta grande potencial alternativo para diagnóstico precoce, simples e rápido do IAM.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.E. Clinical application of markers of cardiac injury: basic concepts and new considerations. **Clin Chim Acta**, v. 284 , p. 127-134, 1999.
- ALDOUS, S. J., Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **Int J of Cardiology**, v. 164, p. 282-294, 2013.
- AMEMIYA, S.; BARD, A.J.; FAN, F.R.F.; MIRKIN, M.V.; UNWIN, P.R., Scanning Electrochemical Microscopy Annu. Rev. **Anal Chem**, v. 1, p. 95-131, 2008.
- ARYA, S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosens Bioelectron**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- BARD, A. J.; MIRKIN, M. V. EDS - **Scanning Electrochemical Microscopy**; Marcel Dekker: New York, 2012.
- BARD, A.J.; FAN, F.R.F.; KWAK, J.; LEV, O. "Scanning Electrochemical Microscopy. An Introduction and Principles". **Anal Chem**, v. 61, p. 132-138, 1989.
- BATLOUNI, M. Interação placa, endotélio, coagulação e isquemia aguda. **RSCESP**, v. 3, p. 6-13, 1993.
- BENTERS, R.; NIEMEYER, C.M.; WOHRLE, D. Dendrimer-Activated Solid Supports for Nucleic Acid and Protein Microarrays. **Chem Biochem**, v. 3, p. 686-694, 2001.
- BERENSON A. B.; POHLMEIER A. M.; LAZ T. H.; RAHMAN M.; SAADE G. Obesity Risk Knowledge, Weight Misperception, and Diet and Health-Related Attitudes among Women Intending to Become Pregnant. **J Acad Nut Diet, In Press, Corr. Proof, Available online**, 2015.
- BERGNER, S.; VATSYAYAN, P.; MATYSIK, F. Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells - a review. **Anal Chim Acta**, v. 775, p. 1-13, 2013.
- BRADBURY, C.R.; ZHAO, J.; FERMIN, D.J. Distance-independent charge-transfer resistance at gold electrodes modified by thiol monolayers and metal nanoparticles. **J of Physical Chemistry**, v. 112, p. 10153-10160, 2008.
- BROGAN, JR., G.X.; FRIEDMAN, S.; MCCUSKEY, C. et al. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. **Ann Emerg Med**, v. 24, p. 665-671, 1994.
- BRUSH, J.E. JR.; BRAND D.A.; ACAMPORA D.; CHALMER B.; WACKERS, F.J., Use of the initial electrocardiogram to predict in-hospital complications of acute myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 312, p. 1137-1141, 1985.
- BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; and VÖGTLE, F. "Cascade – and Nonskid-Chain-like" Syntheses of molecular cavity topologies. **Synthesis**, v. 405, p. 155-158, 1978.

CAIRNS, J.A.; MISSIRLIS, E.; WALKER, W.H.C. Usefulness of serial determinations of myoglobin and creatine kinase in serum compared for assessment of acute myocardial infarction. **Clin Chem**, v. 29, p. 469-473, 1983.

CARVALHO, R.; RATH, S.; KUBOTA, L. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, p. 97-104, 2003.

CAVALCANTI, G.O. **Caracterização precisa de filmes metálicos e novas propostas de transdutores ópticos por ressonância de plásmons de superfície**. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Pernambuco, Fevereiro, 2013.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosens Bioelectron**, v. 17, p. 1-12, 2002.

CHIDSEY, C.E.D.; LOIACONO, D.N., Chemical functionality in self-assembled monolayers: structural and electrochemical properties. **Langmuir**, v. 6, p. 682, 1990.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.;BLACK, H.R.; et al.; The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. **The JNC 7 report**, v. 289, p. 2560-2572, 2003.

CHOI, S. H.; LEE, J. W.; SIM, S. J. Enhanced performance of a surface plasmon resonance immunosensor for detecting Ab-GAD antibody based on the modified self-assembled monolayers. **Biosens Bioelectron**, v. 21, p. 378-383, 2005.

CHRISTENSON, R.H.; AZZAZY, H.M. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. **Clin Chem**, v. 44, p. 1855-1864, 1998.

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

CIMITAN, S. et al. Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions. **J Med Chem**, v. 48, p. 3536-3546, 2005.

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

CLOONAN, M.J.; BISHOP, G.A.; WILTONSMITH, P.D.; CARTER, I.W.; ALLAN, R.M.; WILCKEN, D.E.L. Enzyme-immunoassay for myoglobin in human-serum and urine – method development, normal values and application to acute myocardial-infarction. **Pathology**, v. 11, p. 689, 1979.

D’ORAZIO, P., Biosensors in clinical chemistry. **Clin Chim Acta**, v. 334, p. 41-69, 2003.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, p. 970-979, 2004.

- DAMOS, F.S.; LUZ, R.C.; KUBOTA, L.T.; Determination of Thickness, dielectric constant of thiol films and kinetic of adsorption using surface plasmon resonance. **Langmuir**, v. 21, p. 602-609, 2005.
- DANNENBERG, O.; BUCK, M.; GRUNZE, M.; Self-Assembly of n-Alkanethiols: A Kinetic Study by Second Harmonic Generation. **J Phys Chem B.**, v. 103, p. 2202-2213, 1999.
- DARAIN, F.; YAGER, P.; GAN, K.L.; TJIN, S.C.; On-chip detection of myoglobin based on fluorescence. **Biosens Bioelectron**, v. 24, p. 1744-1750, 2009.
- DE WINTER, R.J.; KOSTER, R. W.; SCHOTVELD, J. H.; STURK, A.; VAN STRAALEN, J. P.; SANDERS, G. T. Prognostic value of troponin T, myoglobin, and CK-MB mass in patients presenting with chest pain without acute myocardial infarction. **Heart**, v. 75, p. 235-239, 1996.
- DELLAS, C.; PULS, M.; LANKEIT, M.; SCHÄFER, K.; CUNY, M.; BERNER, M.; HASENFUSS, G.; KONSTANTINIDES, S.; Elevated heart-type fatty acid-binding protein levels on admission predict an adverse outcome in normotensive patients with acute pulmonary embolism. **J A Coll of Cardiology**, v. 55, p. 2150-2157, 2010.
- DI SERIO, F.; ANTONELLI, G.; TREROTOLI, P.; TAMPOIA, M.; MATARRESE, A.; PANSINI, N. Appropriateness of point-of-care testing (POCT) in an emergency department **Clin Chim Acta**, v. 333, p. 185-189, 2003.
- DONALD, T.G.; CLOONAN, M.J.; NEALE, C.; WILCKEN, D.E.L. Excretion of myoglobin in urine after acute myocardial-infarction. **Br Heart J.**, v. 39, p. 29, 1977.
- DOUBOVA, L.M.; Electron transfer through single-crystal silver electrode/ n-decanthiol monolayer/NaNO<sub>3</sub> solution interfaces. **Russian J of Electrochem**, v. 46, p. 450-460, 2010.
- DUBOIS, L. H.; NUZZO, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. **Ann Rev Phys Chem**, v. 43, p. 437-463, 1992.
- DUTRA, R. F; MENDES, R. K; SILVA, V. L; KUBOTA, L. T. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **J Pharm Biomed Anal**, v. 43, p. 1744-1750, 2007.
- EDWARDS, M.A.; MARTIN, S.; WHITWORTH, A.L.; MACPHERSON, J.V.; UNWIN, P.R., Scanning Electrochemical Microscopy: Principles and applications to biophysical systems. **Physiol Meas**, v. 27, p. R63-R108, 2006.
- EL-SAID, W. A.; FOUAD, D. M.; EL-SAFETY, S. A.; Ultrasensitive label-free detection of cardiac biomarker myoglobin based on surface-enhanced Raman spectroscopy. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 228, p. 401-409, 2016.
- FONSECA, R. A. S.; RAMOS-JESUS, J.; KUBOTA, L. T.; DUTRA, R. F. A. Nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. **Sensors**, v. 11, p. 10785-10797, 2011.
- FREIRE, S. R.; PESSOA, A. C.; KUBOTA, L. T. Emprego de Monocamadas Auto-

Organizadas no desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.

FRIESS, U.; STARK, M.; Cardiac markers: a clear cause for point-of-care testing **Anal Bioanal Chem**, v. 393, p. 1453-1462, 2009.

FUJIHIRA, M.; RUBINSTEIN I.; RUSLING, J. F. Electron transfer. In: BARD & STRATMANN. **Encyclop of Eltrochem**. Nova York: Wiley-VCH, v. 10, 2007.

GERARD, M.; CHAUBEY, A., Application of conducting polymers to biosensors. **Biosens Bioelectron**, v. 17, p. 345-359, 2002.

GNEDENKO, O.V.; MEZENTSEV, Y.V., MOLNAR, A.A.; LISITSA, A.V.; IVANOV, A.S.; ARCHAKOV, A.I., Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. **Anal Chim Acta**, v. 759, p. 105-109, 2013.

GREEN, R.J.; DAVIES, J.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, J.B. Surface plasmon resonance for real time in situ analysis of Protein adsorption to polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 18, p. 405-413, 1997.

GRUNDY S.M.; PASTERNAK R.; GREENLAND P.; SMITH JR. S.; FUSTER V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. **J Am Coll Cardiol**, v. 34 , p. 1348-1359, 1999.

GUISEPPI-ELIE, A.; RAHMAN, A.R.A.; SHUKLA, N.K.; SAM-modified microdisc electrode arrays (MDEAs) with functionalized carbon-nanotubes. **Electrochim Acta**, v. 55, p. 4247-4255, 2010.

GUPTA E.D.; SAKTHISWARRY, R. Myocardial infarction false alarm: Initial electrocardiogram and cardiac enzymes. **Asian Card & Thoracic Annals**, v. 22, p. 397-401, 2014.

HENRIQUES S.; LÉLIS M.; JESUS H.; ARAÚJO, J.N. Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. **Rev Soc Port Med Interna**, v. 13, p. 113-125, 2006.

HOA, X. D.; KIRK, A. G.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. **Biosens Bioelectron.**, v. 23, n. 2, p. 151-160, 2007.

HOBBS F.D.R.; JUKEMA J.W.; SILVA P.M. DA; MCCORMACK T.; CATAPANO A.L. Barriers to cardiovascular disease risk scoring and primary prevention in Europe. **Qjm-Int. J. Med.**, v. 103, p. 727-739, 2010.

HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody detection. **Biosens Bioeletronic.**, v. 34, p. 12-24, 2012.

HOLMES, J. L.; DAVIS, F.; COLLYER, S. D.; HIGSON, S. P. J. A new application of scanning electrochemical microscopy for the label-free interrogation of antibody-antigen

interactions. **Anal Chim Acta**, v. 689, p. 206-211, 2011.

HOMOLA, J. Eletromagnetic Theory of Surface Plasmon. In: **Surface Plasmon Resonance Based Sensors**. 1st ed. Springer-Verlag, New York, p. 3-44, 2006.

HOMOLA, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. **Chem Rev**, v. 108, p. 462-493, 2008.

HOMOLA, J.; SINCLAIR, Y.; GAUGLITZ. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 54, p. 3-15, 1999.

HU, K.; BARD, A. J.; In Situ Monitoring of Kinetics of Charged Thiol Adsorption on Gold Using an Atomic Force Microscope. **Langmuir**, v. 14, p. 4790-4794, 1998.

HUMBLOT, V.; YALA, J.F; THEBAULT, P.; BOUKERMA, K.; HÉQUET, A.; BERJEAUD, J.M.; PRADIER, C.M.; The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. **Biomaterials**, v. 30, p. 3503-3512, 2009.

ISHITANI, L. H.; FRANCO, G. C.; PERPÉTUO, I. H. O.; FRANÇA, E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 40, p. 684-91, 2006.

JACROUX, T.; BOTTENUS, D.; RIECK, B.; IVORY, C.F.; DONG, W. Cationic isotachopheresis separation of the biomarker cardiac troponin I from a high-abundance contaminant, serum albumin. **Electrophoresis**, v. 35, p. 2029-2038, 2014.

JARROS, I. C.; ZANUSSO JR, G. Cardiac risk assessment and diagnosis of acute myocardial Infarction in clinical laboratory. **Uningá Review**, v. 19, p. 05-13, 2014.

JONHSSON, B.; LOFAS, S.; LINQUIST, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. **Anal Biochem**, v. 198, p. 268-277, 1991.

JUSTINO, C.I.L.; SANTOS, T.A.P.R.; DUARTE, A.C. Biossensores com nanotubos de carbono para aplicações clínicas: avanços tecnológicos. **Captar**, v. 4, p. 1-12, 2013.

KAKIUCHI, T. et al. Double-Layer-Capacitance Titration of Self-Assembled Monolayers of  $\alpha$ -Functionalized Alkanethiols on Au (111) Surface. **Langmuir**, v. 16, p. 5397-5401.

KAKOTI, A.; GOSWAMI, P. Heart type fatty acid binding protein: Structure, function and biosensing applications for early detection of myocardial infarction. **Biosens Bioelectron**, v. 43, p. 400-411, 2013.

KIHARA, Y. After the triumph of cardiovascular medicine over acute myocardial infarction at the end of the 20th century. Can we predict the onset of acute coronary syndrome? (Con). **Circ. J.**, v. 75, p. 2019-2026, 2011.

KILPATRICK, W. S.; WOSORNU, J. B.; MCGUINES, J. B.; GLEN, A. C. A.; Early diagnosis of acute myocardial infarction: CK-MB and myoglobin compared. **Ann Clin Biochem.**, v. 30, p. 435-438, 1993.

KIM, H.-C.; LEE S.-K.; JEON, W. B.; LYU, H.-K.; LEE, S.W.; JEONG,S.W. Detection of C-reactive protein on a functional poly(thiophene) self-assembled monolayer using surface plasmon resonance. **Ultramicroscopy**, v. 108, p. 1379–1383, 2008.

KIM, M. et al. Detection of Bax protein conformational change using a surface plasmon resonance imaging-based antibody chip. **Biochem Bioph Res Co**, v. 338, n. 4, p. 1834-1838, 2005.

KWAK, J.; BARD, A. J., Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode. **Anal Chem**, v. 61, p. 1221-1227, 1989.

LAPERCHE, T.; STEG, P. G.; DEHOUX, M.; BENESSIANO, J.; et al.; **Circulation**, v. 92, p. 2072-2086, 1995.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A.; Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **J of Crystal Growth** , v. 233, p. 367-374, 2001.

LEE, P. T.; COMPTON, R. G., Selective electrochemical detection of thiol biomarkers in saliva using multiwalled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 209, p. 983–988, 2015.

LEISY, P. J.; COEYTAUX R. R.; WAGNER, G. S.; CHUNG, E. H.; MCBROOM, A. J.; GREEN, C. L.; WILLIAMS, J. W.; SANDERS, G. D. ECG-based signal analysis technologies for evaluating patients with acute coronary syndrome: a systematic review. **J Electrocardiol**, v. 46, p. 92–97, 2013.

LIAO, J.; CHAN, C. P.; CHEUNG, Y.; LU, J.; LUO, Y.; CAUTHERLEY, G. W. H.; GLATZ, J. F. C.; RENNEBERG R. Human heart-type fatty acid-binding protein for on-site diagnosis of early acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**, v. 133, p. 420-423, 2009.

LIN, J., JU, H., Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosens Bioelectron**, v. 20, p. 1461–1470, 2005.

LIU, B., BARD, A. J., MIRKIN, M. V., CREAGER, S. E. Electron Transfer at Self-Assembled Monolayers Measured by Scanning Electrochemical Microscopy. **J Am Chem Soc**, v. 126, p. 1485-1492, 2004.

LIU, J.T.; CHEN, C.J.; IKOMA, T.; YOSHIOKA, T.; CROSS, J.S. et al., Surface plasmon resonance biosensor with high anti-fouling ability for the detection of cardiac marker troponin T. **Anal Chim Acta**, v. 703, p. 80– 86,2011.

LIU, L.; QIU, C. L.; CHEN, Q.; ZHANG, S. M.; Corrosion behavior of Zr-based bulk metallic glasses in different artificial body fluids. **J Alloy Compd**, v. 425, p. 268-273, 2006.

LIU, X.; SUN, Y.; SONG, D.; ZHANG, Q.; TIAN ,Y.; ZHANG, H., Sensitivity-enhancement of wavelength-modulation surface plasmon resonance biosensor for human complement factor 4. **Anal Biochem**, v. 333, p. 99-104, 2004.

LOPEZ, J. R., **The Use of Scanning Electrochemical Microscopy for the Detection and Quantification of Adsorbed Intermediates at Electrodes**. The University of Texas at Austin, 2010.

LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO R. G. Self- Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chem Rev**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.

LU, X.; YUAN, H.; ZUO, G.; YANG. J. Study of the size and separation of pinholes in the self-assembled thiol-porphyrin monolayers on gold electrodes **Thin Solid Films**, v. 516, p. 6476-6482, 2008.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHANB, D. W. Immunosensors – principles and applications to clinical chemistry. **Clin Chim Acta**, v. 314, p. 1-26, 2001.

MACKAY J.; MENSAH G.A. **The atlas of heart disease and stroke**. Geneva: World Health Organization in collaboration with the Centres for Disease Control and Prevention, 2004.

MASCINI, M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, v. 13, p. 637-657, 2008.

MASSON, J.F.; OBANDO, L.; BEAUDOIN, S.; BOOKSH, K.; Sensitive and real-time fiber-optic-based surface plasmon resonance sensors for myoglobin and cardiac troponin. **Talanta**, v. 62, p. 865–870, 2004.

MATHEW. T.; MENOWN, I.; SMITH, B.; SMYE, M.; NESBITT, S.; YOUNG I.; ADGEY, A.A.J. Diagnosis and risk stratification of patients with anginal pain and non-diagnostic electrocardiograms. **Q J Med**, v. 92, p 565-571, 1999.

MCDONNELL,B.; HEARTY, S.; BRAHMBHATT, S.; O’KENNEDY, R.; A high affinity recombinant antibody permits simple and sensitive one-step direct detection of myeloperoxidase. **Anal Biochem**, v. 410, p. 1-6, 2010.

MOLLER, N.; FOSS, A. C. H.; GRAVHOLT, C. H.; MORTENSEN, U. M.; POULSEN, S. H.; MOGENSEN, C. E. Myocardial injury with biomarker elevation in diabetic ketoacidosis. **J Diabetes Complicat**, v. 19, p. 361-363, 2005.

MOREIRA, C. S.; LIMA, A.; NEFF, H.; NETO, A.; THIRSTRUP, C., Temperature dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface. **Sensor Actuat B-Chem**, vol. 134, p. 854-862, 2008.

MULLER-BARDORFF, M.; HALLERMAYER, K.; SCHRODER, A.; EBERT, C.; BORGYA, A.; GERHARDT, W.; REMPPIS, R.; ZEHELEIN, J.; KATUS, H. A., Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: Assay development and analytical and clinical validation. **Clin Chem**, v. 43, p. 458-466, 1997.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. **The global burden of disease**: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. Harvard School of Health, USA, 1996.

NAGY, G.; NAGY, L., Scanning electrochemical microscopy: a new way of making

electrochemical experiments **Fres J of Anal Chem**, v. 366, p. 735-744, 2000.

NEWBY, L. K.; STORROW, A. B.; GIBLER, W. B.; GARVEY, J. L.; et al.; The Chest Pain Evaluation by Creatine Kinase-MB, Myoglobin, and Troponin I (CHECKMATE) Study. **Circulation**, v 103, p 1832-1837, 2001.

OLI, M.W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies. **J Microbiol Methods**, v. 65, p. 503-511, 2006.

OLIVEIRA, C. P. de. **Desenvolvimento de uma camada de reconhecimento biológico de ligação universal para utilização em imunoenaios**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Superior Técnico, 2013.

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, H.C.; MEDEIROS, E.S. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 3: Biossensores. **Rev Elect Mat Proc**, v 8, p 11, 2013.

OSAKA, T.; YOSHINO, M.; New formation process of plating thin films on several substrates by means of self-assembled monolayer (SAM) process. **Electrochim Acta**, v. 53, p. 271-277, 2007.

PARK, B.W.; KIM, D.S.; YOON, D.Y.; Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. **Kor J Chem Engen**, v. 28, p. 64-70, 2011.

PATEL, N.; DAVIES, M.C.; HEATON, R.J.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M. A scanning probe microscopy study of the physisorption and chemisorption of protein molecules onto carboxylate terminated self-assembled monolayers. **Appl Phys A**, v. 66, p. S569-S574, 1998.

PAWULA, M.; ALTINTAS, Z.; TOTHILL, I. E.; SPR detection of cardiac troponin T for acute myocardial infarction. **Talanta**, v. 146, p. 823-830, 2016.

PEI, R.; YANG, X.; WANG, E., Enhanced surface plasmon resonance immunoassay for human complement factor 4. **Anal Chim Acta**, v. 453, p. 173-179, 2002.

PETERLINZ, K. A.; GEORGIADIS, R.; In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy. **Langmuir**, v. 12, p. 4731-4749, 1996.

POWELL, S.; FRIEDLANDER, E.; SHIHABI, Z.; Myoglobin determination by high-performance liquid chromatography. **J Chromatog A**, v. 317, p. 87-92, 1984.

PRASAD, D.S. ZUBAIR KABIR; DASH, A.K.; DAS B.C. Cardiovascular risk factors in developing countries: A review of clinico-epidemiological evidence. **CVD Prev Control**, v. 5, p. 115-123, 2010.

PREECHABURANA, P. et al. Surface Plasmon Resonance Chemical Sensing on Cell Phones. **Ang Chem Int Ed**, v. 51, p. 11585-11588, 2012.

PREST, R. M. et al. Potential-assisted deposition of mixed alkanethiol self-assembled monolayers. **Electrochim Acta**, v. 55, p. 2712-2720, 2010.

QIAN, B.; KATSAROS, D.; LU, L., et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 117, p. 131-140, 2009.

QURESHI, A.; GURBUZB, Y.; NIAZIA, J.H. Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 171-172, p. 62-76, 2012.

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; KARIMI-MALEH, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. **J App Electrochem**, v. 39, p. 1169-1175, 2009.

RASOOLY, A., Biosensor technologies. **Methods**, Orlando, v. 37, p. 1-3, 2005.

RICCARDI, C.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H., Amperometric immunosensor. **Química Nova**, v. 25, p. 316-320, 2002.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCI, G., A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Anal Chim Acta**, v. 605, p. 111-129, 2007.

RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Spying on HIV with SPR. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 124-133, 2003.

ROBERTS, W.S., LONSDALE, D. J., GRIFFITHS, J., HIGSON, S.P.J. Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems. **Biosens Bioelectron**, v. 23, p. 301-318, 2007.

ROSARIO-CASTRO, B.; FACHINI, E.R.; HERNANDEZ, J.; et al.; Electrochemical and surface characterization of 4-aminothiophenol adsorption at polycrystalline platinum electrodes. **Langmuir**, v. 22, p. 6102-6108, 2006.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. **Madri: El Indust Gráf**, p. 113, 2005

RUSLING, J.F.; KUMAR, C.V.; GUTKIND, J.S.; PATEL, V., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **Analyst**, v. 135, p. 2496-2511, 2010.

SALLACH, S.M.; NOWAK, R.; HUDSON, M.P.; TOKARSKI, G.; KHOURY, N.; TOMLANOVICH, M.C.; JACOBSEN, G.; LEMOS, J.A. DE; MCCORD, J. A., Change in Serum Myoglobin to Detect Acute Myocardial Infarction in Patients With Normal Troponin I Levels. **J Cardiol**, v. 94, p. 864-867, 2004.

SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. **Chem Soc Rev**, v. 40, p. 2567-2592, 2011.

SCHREIBER, F.; Structure and growth of self-assembling monolayers. **Prog Surf Sci**, v. 65,

p. 151-256, 2000.

SCHUCK, P.; Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport. **Biophys J**, v. 70, p. 1230, 1996.

SHANKARAN, D. R.; GOBI, K. V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 121, p. 158-177, 2007.

SHARMA, R.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**, v. 519, p. 1167-1170, 2010.

SHEN, M., BARD, A.J., Localized Electron Transfer and the Effect of Tunneling on the Rates of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  Oxidation and Reduction As Measured by Scanning Electrochemical Microscopy. **J Am Chem Soc**, v. 133, p. 15737–15742, 2011.

SHIH, J.J.; KUO, K.H.; YANG, C.M.; et al. Thermal dissociation of  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  on  $\text{Cu}(111)$ . **Surf Sci**, v. 602, p. 3266-3271, 2008.

SILVA, S.H.; MORESCO, R.N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Scientia Medica**, p. 132-42, 2011.

SINGH V.; MARTINEZCLARK P.; PASCUAL M.; et al. Cardiac biomarkers- the old and the new: a review. **Coron Artery Dis**, v. 21, p. 244-256, 2010.

SOELBERG, S. D. et al. A portable surface plasmon resonance sensor system for real-time monitoring of small to large analytes. **J Ind Microbiol Biot**, v. 32, p. 669-874, 2005.

SOUTO, D. E. P.; SILVA J.V.; MARTINS, H.R.; REIS, A.B.; .LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S.; Development of a label free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. **Biosens Bioeletron**, v. 46, p. 22-29, 2013.

STAPLETON, J.J.; DANIEL, T.A.; UPPILI, S.; et al. Self-assembly, characterization, and chemical stability of isocyanide-bound molecular wire monolayers on gold and palladium surfaces. **Langmuir**, v. 21, p. 11061-11070, 2005.

STONE, M.J.; WATERMAN M.R.; HARIMOTO, D.; MURRAY, G.; WILLSON, N.; PLATT, M.R.; BLOMQUIST, G.; WILLERSON J.T. Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial-infarction . **Br Heart J**, v. 39, p. 375, 1977.

SUPRUN, E.V.; SHILOVSKAYA, A.L.; LISITSA, A.V.; BULKO, T.V.; SHUMYANTSEVA, V.V., ARCHAKOV, A.I. Electrochemical immunosensor based on metal nanoparticles for cardiac myoglobin detection in human blood plasma. **Electroanal**, v. 23, p 1051, 2011.

SZABO, A., STOLZ, L., GRANZOW, R., Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). **Cur Opin Struct Biol**, v 5, p 699-705, 1995.

TANG, D., NIESSNER, R., KNOPP, D., Flow-injection electrochemical immunosensor for the detection of human IgG based on glucose oxidase – derivated biomimetic interface. **Biosens Bioelectron**, v. 24, p. 2125-2130, 2009.

TANG, W.H.W.; FRANCIS, G.S., MORROW, D.A.; NEWBY, L.K.; CANNON, C.P.; JESSE, R.L.; STORROW, A.B.; CHRISTENSON, R.H. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. **Circulation**, v. 116, p. E99-E109, 2007.

THIELMANN, M.; MASSOUDY, P.; MARGGRAF G.; et al. Role of troponin I, myoglobin, and creatine kinase for the detection of early graft failure following coronary artery bypass grafting. **Eur J Cardiot Surg**, v. 26 , p. 102–109, 2004.

THILLAIVINAYAGALINGAM, P., GOMMEAUX, J., MCLOUGHLIN, M., COLLINS, D., Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. **J Chromatogr B**, v. 878, p. 149-153, 2009.

THOUGHTON, E.B.; BAIN, C.D.; WHITESIDES, G.M.; et al.; Monolayers films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkylproperties, and reactivity of constituent functional sulfides from solution onto gols substrates: structure, groups. **Langmuir**, v. 4, p. 365-385, 1998.

ULMAN, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chem Rev**, v. 96, p. 1533–1554, 1996.

VAISOCHEROVA, H. et al. Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus. **Biosens Bioelectron**, v. 22, p. 1020-1026, 2007.

VERCELLI, B.; ZOTTI, G.; BERLIN, A.; et al., Polypyrrole self-assembled monolayers and electrostatically assembled multilayers on gold and platinum electrodes for molecular junctions. **Chem Mater**, v. 18, p. 3754-3763, 2006.

VERICAT, C. et al. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chem Soc Rev**, v. 39, p. 1805-1834, 2010.

WALCZAK, M. M. et al. Structure and Interfacial Properties of Spontaneously Adsorbed n-Alkanethiolate Monolayers on Evaporated Silver Surfaces. **J Am Chem**, v. 113, p. 2310-2378, 1991.

WANG, J. et al. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, p. 2043- 2081, 2008.

WANG, S.; FORZANI, E. S.; TAO, N. Detection of heavy metal ions in water by highresolution surface plasmon resonance spectroscopy combined with anodic stripping voltammetry. **Anal Chem.**, v. 79, p. 4427-4432, 2007.

WAARD, H.; VAN 'T SANT, P.; Use of Serum Myoglobin Assays for Urine Myoglobin Measurements Can Cause False-Negative Results. **Clin Chem**, v. 55, p. 1240–1241, 2009.

WEEISHAAR, D.E.; LAMP, D. B.; PORTER, M. D.; Thermodynamically controlled electrochemical formation of thiolate monolayers at gold: characterization and comparison to self-assembled analogs. **J Am Chem Soc**, v. 114, p. 5860-5862, 1992.

WHITE, H.D.; CHEW, D.P.; Acute myocardial infarction. **The Lancet**, v. 372, p. 570-584, 2008.

WHITESIDES, G.M.; LAIBINIS, P. E., Wet chemical approaches to the characterization of organic-self-assembled monolayers, wetting, and the physical organic-chemistry of the solid liquid interface. **Langmuir**, v. 6, p. 87, 1990.

WHO, Cardiovascular Disease (CVDs) Fact Sheet, **World Health Organization**, Mediacentre, 2011.

WU, H. et al. Rapid detection of melamine based on immunoassay using portable surface plasmon resonance biosensor. **Sensor Actuat B-Chem**, v. 178, p. 541- 546, 2013.

YANG, L.J.; Li, Y.B.; ERF, G.F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Anal Chem**, v. 76, p. 1107-1113, 2004.

YANG, W.; GOODING. J. J.; HIBBERT, D. B. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of l-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. **J Electroanal Chem**, v. 516, p. 10-16, 2001.

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

ZHAI, J.; CUI, H.; YANG, R., DNA based biosensors. **Biotechnol Adv**, v. 15, p. 43-58, 1997.

ZHANG, G.J.; NING, Y. Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: a review. **Anal Chim Acta**, v. 749, p. 1-15, 2012.

ZHANG, W.; KRISHNAN, N.; BECKER, D. F. Kinetic and thermodynamic analysis of Bradyrhizobium japonicum PutA-membrane associations. **Arch Biochem Biophys**, v. 445, p. 174-183, 2006.